Handbuch der Technischen Mykologie

herausg. von F. Lafar

Vierter Band: Specielle Morphologie und Physiologie der Hefen und Schimmelpilze.



Jena, Verlag von
Gustav Fischer
1907







Handbuch

der

Technischen Mykologie

für technische Chemiker, Nahrungsmittelchemiker, Gärungstechniker, Agrikulturchemiker, Landwirte, Kulturingenieure, Forstwirte und Pharmaceuten

unter Mitwirkung hervorragender Fachgenossen

herausgegeben von

Dr. FRANZ LAFAR,
o. ö. Professor der Gärungsphysiologie und Bakteriologie an der k. k. Technischen Hochschule zu Wien.

In 5 Bänden.

(Zweite, wesentlich erweiterte Auflage von LAFAR, Technische Mykologie.)

Vierter Band.

Specielle Morphologie und Physiologie der Hefen und Schimmelpilze.



Jena,
Verlag von Gustav Fischer.
1907.

Handbuch

der

Technischen Mykologie.

Vierter Band.

Spezielle Morphologie und Physiologie der Hefen und Schimmelpilze.

Unter Mitwirkung der Herren

Dr. **A. Bau** in Bremen, Prof. Dr. **M. Hahn** in München, **Alb. Klöcker** in Kopenhagen, Prof. Dr. **G. Lindau** in Berlin, Prof. Dr. **R. Meissner** in Weinsberg, Prof. Dr. **H. Müller-Thurgau** in Wädenswil, Dr. **R. Rapp** in München, Prof. Dr. **C. Wehmer** in Hannover, Dr. **H. Wichmann** in Wien, Prof. Dr. **H. Will** in München

herausgegeben von

Dr. FRANZ LAFAR,

o. ö. Professor der Gärungsphysiologie und Bakteriologie
an der k. k. Technischen Hochschule zu Wien.

Mit einer Tafel, einer Tabelle und 123 Abbildungen im Text.



Jena,
Verlag von Gustav Fischer.
1905—1907.

Inhaltsverzeichnis.

Erster Abschnitt.

Allgemeine Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Anatomie der Saccharomyceten und Schizosaccharomyceten.

Seite

1. Kapitel.

2. Kapitel.

Zweiter Abschnitt.

Spezielle Physiologie der Ernährung und der Vermehrung und Methodik der Reinzüchtung der Hefen.

Von Dr. Lafar.

3. Kapitel.

Seite

4. Kapitel.

5. Kapitel.

6. Kapitel.

Dritter Abschnitt.

Abstammung und Kreislauf der Saccharomyceten. Deren Variabilität. Systematik der Familien der Saccharomyceten und Schizosaccharomyceten.

Von Albert Klöcker.

7. Kapitel.

8. Kapitel.

9. Kapitel.

Vierter Abschnitt.

Morphologie, Physiologie und Systematik einiger technisch wichtiger höherer Ascomyceten und verwandter Formen.

Fünfter Abschnitt.

Allgemeine Morphologie, Physiologie und Systematik technisch wichtiger Sprosspilze aus der Gruppe der Fungi imperfecti.

Siebenter Abschnitt.

Mucoraceengärungen.

Von Prof. Dr. C. Wehmer.

Seite

21. Kapitel.

22. Kapitel.



Erster Abschnitt.

Allgemeine Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Anatomie der Saccharomyceten und Schizosaccharomyceten.

(Manuskript-Einlauf: 21. März 1904.)

1. Kapitel.

Allgemeine Morphologie und Entwicklungsgeschichte.*)

Von Albert Klöcker,
Kopenhagen.

(Mit Tafel I.)

§ 1. Sproßpilze, Hefen, Saccharomyceten und Schizosaccharomyceten.

In den Jahren 1836—1837 zeigten Cagniard-Latour (1) und ungefähr gleichzeitig Schwann (1) und Kützing (1), daß die Alkoholgärung durch eine einzellige Pflanze hervorgerufen wird. Zwei Jahre später wurde ferner durch Schwann (2) nachgewiesen, daß diese Pflanze Endo- 5 sporenbildung besitzt, und im Jahre 1870 führte Reess (2) die Gattung *Saccharomyces* (Zuckerpilz), mit welchem Namen die Alkoholhefe durch Meyen (s. Bd. I, S. 14) belegt worden war, zu derjenigen Abteilung der Pilze hin, welche man als die der Ascomyceten, Schlauchpilze, bezeichnet. Die Endosporen erzeugende Zelle wird Ascus, Schlauch, ge- 10 nannt (s. Bd. I, S. 188 u. 208). Im Sinne Reess' wären dann als *Saccharomycetes* nur diejenigen Hefenpilze zu bezeichnen, welche imstande sind, Endosporen zu bilden. Aber sowohl er als sein Lehrer de Bary (1) waren in diesem Punkte nicht konsequent, indem sie unter *Saccharomyces* auch solche Formen, wie z. B. *Mycoderma* und *Chalara*, einreihten, welche 15

*) Wie aus meinen Beiträgen in dem vorliegenden Handbuche ersichtlich ist, habe ich an vielen Stellen in beträchtlichem Ausmaße den Text der ersten Auflage der „Technischen Mykologie“ benutzt und gestatte mir auch hier, Herrn Prof. Dr. Lafar für seine freundlichst gegebene Erlaubnis meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.
Verf.

beide, wie wir später sehen werden, die Fähigkeit zur Sporenbildung nicht besitzen.

Mit E. Chr. Hansen (2) fing in den Jahren 1881—83 auf diesem Gebiete eine neue Epoche an. Er arbeitete zuverlässige Verfahren zur Gewinnung von Reinzuchten aus, und von diesen ausgehend, führte er die experimentelle Untersuchung nicht nur in die Biologie sondern auch in die systematische Beschreibung dieser Pilze ein und zerlegte das Genus *Saccharomyces* in seine Einheiten (Species, Rasse, Varietät). Hansen ist streng konsequent in seiner Auffassung des Hauptcharakters der Gattung: Saccharomyceten sind nur diejenigen Sproßpilze, welche Endosporen bilden können. Reess und seine Nachfolger hatten die Arten nach Gestalt und Größe der Zellen durch mikroskopische Untersuchung der in den gärenden Flüssigkeiten befindlichen unreinen Vegetationen aufgestellt. Hansen wies das ganz Unhaltbare in diesem Vorgehen nach, und indem er von neuen Gesichtspunkten ausging, entdeckte er neue Charaktere. Wir werden im folgenden dies näher besprechen.

Die saccharomycesähnlichen Alkoholhefen faßte er vorläufig unter dem Namen *Torula* zusammen, welcher von Pasteur zur Bezeichnung gewisser Hefenpilze gebraucht worden war. Hansen hob jedoch hervor, daß es sich gewiß einmal zeigen werde, daß sie in verschiedenen Abteilungen des Systems einzureihen sind.

Gemeinsam für *Saccharomyces* und *Torula* ist die Art und Weise, auf welche die vegetative Vermehrung vor sich geht, nämlich die Sproßbildung (s. Bd. I, S. 172 u. 173). Sproßbildung kann aber auch bei anderen Pilzen stattfinden, z. B. bei den Sporen der Brandpilze (s. Bd. I, S. 217), weshalb auch letztere als Hefen bezeichnet worden sind, was in hohem Grade Verwirrung hervorgerufen hat. Um die zu den oben angeführten Gruppen gehörigen Hefen voneinander zu unterscheiden, sind also in allen Fällen die systematischen Namen zu benutzen.

Es wird deshalb hier notwendig sein, darzulegen, was wir im vorliegenden Werke unter Sproßpilzen, Hefe und Saccharomyceten verstehen. Wir machen sofort darauf aufmerksam, daß die zwei ersteren Ausdrücke keine systematischen Bezeichnungen sind. Als Sproßpilze bezeichnen wir alle solche einzelligen Pilze, welche imstande sind, Sprosse zu treiben. Einige Sproßpilze besitzen die Fähigkeit, in zuckerhaltigen Flüssigkeiten Gärung hervorzurufen; wir nennen sie Hefen. Mit diesem Namen belegen wir aber auch einige einzelligen Hefenpilze, welche keine Sprosse treiben, sondern sich durch Abspaltung vermehren, das sind die Schizosaccharomyceten. Unter Hefen verstehen wir also einzellige Eumyceten, welche Alkoholgärung hervorrufen können. Unter den Hefen finden sich teils solche, welche Endosporen in ihrem Innern entwickeln, teils solche, welche diese Fähigkeit nicht besitzen. Zu den letzteren gehören die sogenannten *Torula*-Arten. Die sporenbildenden Formen gehören alle in die Familien der Saccharomyceten und Schizosaccharomyceten. Den Saccharomyceten zählen wir aber auch diejenigen wenigen endosporenbildenden Formen zu, welche nicht Alkoholgärung hervorrufen. Unter *Saccharomycetes* verstehen wir also einzellige Pilze, welche sich durch Sprossung vermehren und Endosporen bilden.[1])

[1]) Nachdem das Manuskript eingeliefert worden war, hat E. Chr. Hansen (9) seine „Grundlinien zur Systematik der Saccharomyceten“ veröffentlicht. Die von ihm darin

Nachdem wir so die drei Begriffe Sproßpilze, Hefen und Saccharomyceten festgestellt haben, werden wir genauer die vegetative Vermehrung der Saccharomyceten betrachten, indem wir in erster Linie die Gattung *Saccharomyces* heranziehen, wozu weitaus der größte Teil der in der Gärungsindustrie angewandten Hefen gehört. 5

§ 2. Die Vegetation in Flüssigkeiten.

In der Familie der *Saccharomycetes* geht, wie schon zuvor gesagt, die vegetative Vermehrung durch Sprossung vor sich (*Fig. 1*), bei den *Schizosaccharomycetes* dagegen durch Abspaltung (*Fig. 2*). Die Sprossung ver-



Fig. 1. Hefe *Johannisberg I.*
Junge Zucht in Weinmost. — Vergr. 800.
Nach ADERHOLD.



Fig. 2. *Schizosaccharomyces octosporus* BEIJERINCK.
Einen Tag alte Zucht in Bierwürze bei 25° C. — Vergr. 1000.
Nach SCHIÖNNING.

läuft in der Weise, daß die Mutterzelle eine kleine Ausstülpung hervor- 10 treibt, welche allmählich an Größe zunimmt. Diese junge Zelle kann sich entweder von der Mutterzelle trennen, oder aber mit ihr in Verbindung bleiben; in letzterem Falle bilden sich dann oft ansehnliche Sproßverbände. Auf dieser Fähigkeit der Zellen, miteinander in Verbindung zu bleiben, beruht hauptsächlich die Klärung des Bieres 15 (s. 6. Kap. d. V. Bds.). Uebrigens stellen sich die einzelnen Arten in dieser Beziehung verschieden.

In der Gattung *Schizosaccharomyces* bildet sich ungefähr in der Mitte der Mutterzelle eine Querwand, welche sich spaltet und dadurch zwei neue Zellen freimacht. 20

Das Ergebnis der vegetativen Vermehrung sind also bei der Familie der *Saccharomycetes* mehr oder weniger verzweigte Kolonien. Deren Aussehen und Beschaffenheit ist in hohem Grade von dem Nährboden abhängig. In Nährflüssigkeiten bilden weitaus die meisten Saccharomyceten sofort

unternommene Abtrennung der Saccharomyceten von den Schizosaccharomyceten habe ich während der Korrektur berücksichtigen können. Dagegen habe ich die anderen systematischen Bezeichnungen belassen müssen. Eine Darlegung der neuen systematischen Gesichtspunkte und der damit in Verbindung stehenden neuen Bezeichnungen ist im 9. Kapitel des vorliegenden Bandes zu finden.

Bodensatzhefe und erst nach einiger Zeit an der Oberfläche der Flüssigkeit eine Haut; bei einigen Arten aber ist bei günstiger Temperatur, z. B. schon bei gewöhnlicher Zimmertemperatur, die Hautbildung die eigentliche Wuchsform und tritt sofort ein, nachdem die Aussaat stattgefunden hat. Die in der Praxis angewandten Hefenarten gehören alle der ersteren Gruppe an. Die Kolonienbildung auf festen Nährböden werden wir im § 4 besprechen. Hier an dieser Stelle soll nur noch die Bemerkung angefügt werden, daß diejenigen der vorhin bezeichneten Arten, welche bei günstiger Temperatur an der Oberfläche der Nährflüssigkeit sofort zu einer Hautdecke sich entwickeln, in der Nähe der Grenztemperaturen (Maximum und Minimum) nicht solche Haut, sondern nur Bodensatzhefe bilden. Hansen (8) hat dies am *Sacch. anomalus* und am *Sacch. membranaefaciens* dargetan.

Bevor wir an die im Obenstehenden erwähnten Verhältnisse näher herantreten, werden wir die Sprossung selbst genauer betrachten.

Schon im Jahre 1843 beobachtete E. Mitscherlich (1) die Sprossung der einzelnen Hefenzelle in Bierwürze in einem gewöhnlichen zugekitteten mikroskopischen Präparate (*Fig. 3*). Als dieses dann drei Tage alt war,

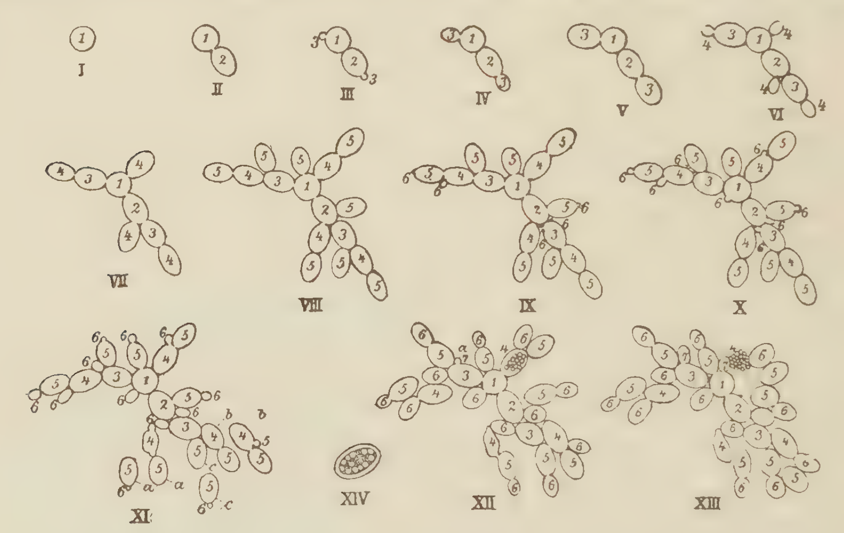


Fig. 3. Die Vermehrung der Oberhefe.
I 26. Mai 7 Uhr abends. — *II* 27. Mai 8 Uhr morgens. *III* 9 Uhr. *IV* 10 Uhr 20 Min. *V* 12 Uhr. *VI* 3 Uhr 30 Min. *VII* 8 Uhr abends. — *VIII* 28. Mai 8 Uhr morgens. *IX* 10 Uhr. *X* 11 Uhr. *XI* 1 Uhr. — *XII* 29. Mai 8 Uhr abends. — *XIII* 30. Mai. *XIV* 2. Juni 12 Uhr. — Nach Mitscherlich.

hatte eine Zelle unter diesen Verhältnissen 29 Nachkommen gebildet, und es dauerte 13 Stunden, ehe die ausgesäte Zelle eine neue Zelle von derselben Größe hervorgebracht hatte (*Fig. 3, II*). In derselben Weise verfuhr Kützing (1) und mehrere Jahre danach auch Pasteur (1). Letzterer benutzte jedoch Traubensaft anstatt Bierwürze; er fand, daß jede der in jenen eingebrachten zwei Hefenzellen im Laufe von 2 Stunden drei Zellen gebildet hatte.

Eine Vergleichung der angegebenen Zeitdauer für die Entstehung einer neuen Zelle läßt große Unterschiede darin bemerken. Die Ursache hiervon ist nicht erkennbar, und man bekommt auch nur die allgemeine

Aufklärung, daß die Zellen sich durch Sprossung vermehren. Wir haben diese Versuche aufgezeichnet, weil sie die ältesten sind, und wir haben die beistehende *Fig. 3* bloß als Beispiel der vortrefflichen Abbildungen wiedergegeben, welche Mitscherlich schon in jenem frühen Zeitpunkte geliefert hat. –

Angenommen, wir beimpfen eine Reihe von Kölbchen, welche eine für das Hefenwachstum günstige und mit einer gärfähigen Zuckerart versetzte klare Nährlösung enthalten, mit je einer Spur einer Reinzucht von verschiedenartigen Hefen, wie sie in der Praxis der Brauerei, Brennerei, Weinbereitung usw. vorkommen, und halten dann die angelegten Zuchten bei Zimmertemperatur, so werden wir in ein bis zwei Tagen in allen Kölbchen an dem Eintreten von Trübung und Gasbildung bemerken, daß Zellvermehrung und Gärtätigkeit im Gange ist. Wir werden nun bald eine Sonderung der Kölbchen in zwei Gruppen vornehmen können, und zwar auf Grund des Gärbildes, das sie uns erkennen lassen. Bei der einen Gruppe verbleibt die aus der Aussaat sich entwickelnde Hefenernte während der ganzen Dauer der Gärung fast vollständig innerhalb der Flüssigkeit und zum größten Teil von Anbeginn an auf deren Grunde. Hefen von derartigem Verhalten heißt man **Unterhefen**; sie erregen **Untergärung.** Die angesammelte Hefenernte bezeichnet man als **Bodensatzhefe,** Satzhefe oder Dépôthefe.

Bei der anderen Gruppe wird in dem ersten Abschnitte der hier sehr heftigen und mit Entwicklung großer Mengen von Schaum verbundenen Gärung eine mehr oder minder große Anzahl der aus der Aussaat hervorgegangenen Zellen durch die Schaumblasen über die Oberfläche der Flüssigkeit hinausgehoben und sinkt, sofern das Gefäß hoch genug und also das Ueberschäumen verhütet worden ist, erst nach beendigter Gärung und Zerrinnung des Schaumes wieder in die Flüssigkeit zurück, um dort das Dépôt zu vergrößern. Dies ist das Bild der **Obergärung.** Hefen, welche derart sich betätigen, nennt man **Oberhefen.**

Ausgeprägte Beispiele von Unterhefen sind die Münchner Lagerbierhefen. Hingegen können als in dieser Hinsicht am höchsten entwickelte Oberhefen jene Arten gelten, welche den wesentlichen Bestandteil der nach dem alten (Wiener) Verfahren erzeugten Preßhefe ausmachen. Diese wird ausschließlich nur aus den durch den Schaum aus dem Nährboden (Maische) hinausgehobenen Zellen und deren Tochterzellen gewonnen; denn die innerhalb der Maische verbleibenden Zellen können von dieser praktisch nicht abgetrennt werden. Diese beiden strengen und ausgeprägtesten Vorbilder werden durch viele Zwischenstufen miteinander verbunden.

Prüfen wir nun unter dem Mikroskope bei starker (250—500) Vergrößerung, auf einem Objektträger in einem Tröpfchen Wasser verteilt und mit einem Deckglas bedeckt, je eine Spur von der Satzhefe aus den einzelnen Kölbchen, sobald die Hauptgärung darin sichtlich zu Ende ist. In einer beträchtlichen Anzahl von Proben werden wir die Zellen als kugelrund oder eirund befinden. Die meisten Bierhefen und Branntweinhefen werden uns dieses Bild (im großen und ganzen!) bieten. Weil nun für Bierhefe schon seit Meyen her die Bezeichnung *Saccharomyces cerevisiae* im Gebrauch ist, hat man sich nach und nach daran gewöhnt, von Hefenzellen, welche annähernd kugelig oder eirund und von beträchtlicher Größe sind, zu sagen, sie seien vom **Cerevisiae-Typus.** Die *Fig. 4* gibt dafür ein Beispiel, nämlich von einer durch Hansen (2) aus der Betriebshefe einer obergärigen Brauerei zu Edinburg in Schott-

land reingezüchteten und als deren Hauptbestandteil erkannten obergärigen Hefe, welche den Namen *Sacch. cerevisiae I* erhalten hat.

Die Satzhefe in einer Anzahl anderer Kölbchen wird dadurch von der bisher betrachteten verschieden sein, daß sie Zellen aufweist, welche



Fig. 4. Saccharomyces cerevisiae I Hansen.
Zellen aus der Bodensatzhefe einer jungen Zucht in Bierwürze. — Vergr. 1000.
Nach Hansen.

5 nicht kugelig oder eirund, also einseitig verjüngt sind, sondern die Gestalt von Ellipsoiden haben. Hefen von derartigem Bau wurden von Reess (2) mit der Bezeichnung *Sacch. ellipsoideus* belegt. Der Art-Name ist dann nach und nach zu einer Wuchsformbezeichnung geworden, so daß man also sagt, die Zellen dieser oder jener Hefe seien vom **Ellip-**
10 **soideus-Typus** und dabei zunächst nur das Eine meint, daß die Zellen dieser Art meist von ellipsoidischer Gestalt und etwas kleiner als die des vorgenannten Typus sind. Die *Fig. 5* gibt dafür ein Beispiel an



Fig. 5. Saccharomyces ellipsoideus I Hansen.
Zellen aus der Bodensatzhefe einer jungen Zucht in Bierwürze. — Vergr. 1000.
Nach Hansen.

dem durch Hansen (2) von der Oberfläche reifer Weintrauben gewonnenen *Sacch. ellipsoideus I.* Viele Weinhefenarten zeigen diesen
15 Typus. So ist es denn auch leicht erklärlich, daß bei dem Mangel an

Reinzüchtungsverfahren und also der Unmöglichkeit der Feststellung des Bestehens verschiedener Arten, die Reess'sche Bezeichnung *Sacch. ellipsoideus* bald zu einem Synonym für den Ausdruck Weinhefe überhaupt wurde. Dieser Brauch ist heute nicht mehr zu rechtfertigen, da wir nun schon Weinhefenstämme kennen, deren Zellgestalt nicht mehr dem Ellipsoideus-Typus zugezählt werden kann, sondern kugelig oder gestreckt ist. Andrerseits ist nicht jede Hefe vom Ellipsoideus-Typus auch eine Weinhefe. Ein Beispiel für eine solche andersartige, jedoch in Hinsicht auf Gestalt der Zellen der Bodensatzhefe jener fast gleiche Hefe ist der durch Hansen (2) im Jahre 1883 aus der Betriebshefe der Tuborg-Brauerei zu Kopenhagen abgeschiedene *Sacch. ellipsoideus II*, welcher als eine Krankheitshefe (s. weiter unten) im technischen Sinne sich geltend machte, das heißt, Störung hervorrief. In den späteren Jahren ist durch Aderhold, A. Lendner, Marx, Müller-Thurgau, Osterwalder, W. Seifert, Wortmann u. a. die alte Sammelspecies Reess' in noch mehr Species und Rassen zerlegt worden. Näheres darüber ist insbesondere im 5. Abschnitt des V. Bandes zu finden.

Der zu einer dritten Gruppe vereinte Rest der Kölbchen unserer Versuchsreihe wird dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen der jungen Satzhefe nicht, wie bei der ersten Gruppe, vorwiegend Kugelgestalt oder Eigestalt aufweisen und daß sie auch nicht, wie die der zweiten Gruppe, zum mindesten in ihrer Mehrheit als elliptisch sich erweisen, sondern langgestreckt sind, also einen Umriß ähnlich demjenigen einer Wurst oder eines kurzen, allseits geschlossenen Schlauches haben, der bei manchen Arten auch noch an ein oder zwei Stellen etwas verengt ist. Pasteur (2) hatte derartige Hefenzellen bei seinen Studien über den Wein bemerkt. Reess (2) fand solche während der Nachgärung in den von ihm untersuchten Weinen auftreten und belegte diese Form zu Ehren jenes Forschers mit der Bezeichnung *Sacch. Pastorianus.* Spätere Forscher haben derart gestaltete Hefen noch öfter angetroffen. Diese Speciesbezeichnung ist dann langsam zu einer Gestaltbezeichnung geworden. Wenn man von einer Hefe sagt, daß sie pastoriane Formen zeige oder, noch kürzer ausgedrückt, daß sie vom **Pastorianus-Typus** sei,



Fig. 6. Saccharomyces Pastorianus I Hansen.
Zellen aus der Bodensatzhefe einer jungen Zucht in Bierwürze. — Vergr. 1000.
Nach Hansen.

so soll durch dieses Wort nicht mehr zum Ausdruck kommen als die Tatsache, daß die Bodensatzhefe der betreffenden Art unter den gewöhnlichen Bedingungen ihrer Entwicklung vorwiegend oder ausschließlich Zellen bildet, welche nicht kugelig, eirund oder elliptisch sind, sondern gestreckt, wurstähnlich. Ein Beispiel dafür ist die in *Fig. 6* abgebildete Art *Sacch. Pastorianus I.* Diese Species ist durch Hansen (2) in den Jahren 1880 und 1881 in der Luft der Brauerei Alt-Carlsberg zu Kopenhagen angetroffen worden, und durch seine mit ihr angestellten Untersuchungen wurde dann zum ersten Male die damals brennende Frage über die **Krankheitshefen** in den Brauereien in experimenteller Weise in Angriff genommen; durch seine im Jahre 1883 veröffentlichten Versuche wurde sie völlig klargelegt. Die Krankheitshefen gehören zu den sogenannten **wilden Hefen,** mit welchem Namen wir die in der Natur frei (als Wildlinge) sich findenden Hefen belegen. Im Gegensatze zu diesen heißen jene Hefen, welche für die Praxis der Gärungstechnik gezüchtet (kultiviert) und dort in Dienst gestellt werden, **Kulturhefen.** Mehr besagt dieser Ausdruck nicht, also insbesondere auch nichts über die Abstammung der betreffenden Arten.

Außer den im Obenstehenden genannten Gestalten wird man auch bisweilen Zellen von Zitronengestalt begegnen können. Solche kommen bei *Sacch. Ludwigii* Hansen vor. Es wird sich später Gelegenheit finden, diese interessante Art näher zu betrachten.

Unter mehr oder weniger ungünstigen Züchtungsverhältnissen treten Zellen von unregelmäßiger, ja oft von ganz barocker Gestalt auf. Bisweilen sieht man hantelförmige Zellen. Die Verhältnisse, unter welchen solche auftreten können, werden wir später betrachten.

Bis zu den Untersuchungen Hansen's (2) im Jahre 1882 war man der Meinung, daß die in den Brauereien verwendete Unterhefe immer und überall aus der einen und einzigen Species *Sacch. cerevisiae* bestehe. In seiner ausführlicheren Abhandlung vom Jahre 1883 zeigte er, daß wir unter dem Namen *Sacch. cerevisiae* wie gleichfalls unter den übrigen Reess'schen Speciesbezeichnungen mit einer großen Anzahl von Arten zu rechnen haben, und daß also die Bezeichnungen *Sacch. cerevisiae, Sacch. Pastorianus, Sacch. ellipsoideus* usw. förderhin höchstens nur noch als Gruppenbezeichnungen gelten können. Nicht der geringste Teil der Studien dieses Forschers war seitdem der Frage nach der **Abhängigkeit der Zellgestalt von den Züchtungsbedingungen** und der Klarlegung der Tatsache gewidmet, daß der Charakter einer Hefenspecies, in morphologischer Hinsicht, nicht in der Art der Zellgestalt an und für sich liegt, sondern in der Art der Abhängigkeit der letzteren von den äußeren Bedingungen, deren Ergebnis sie ist. Kennt man jene bis zu einem gewissen Grade, dann ist die Art der Zellgestalt ein sehr wertvolles und ziemlich verläßliches Merkmal. Weil nun jede Lebensäußerung und somit auch die Zellgestalt eine Resultante zweier Komponenten, nämlich der erblich überkommenen Eigenschaften und der Summe aller äußeren Einflüsse ist, wird man selbst dann, wenn man diese letzteren absolut gleich machen könnte, doch schon aus dem anderen Grunde niemals absolute Gleichheit der Zellen einer Zucht erwarten dürfen. Es ist aber überdies, bei der Dürftigkeit unseres Könnens auf chemischem und physikalischem Gebiete, auch die Herstellung absolut gleicher Lebensbedingungen in zwei zu verschiedenen Zeiten angelegten Zuchten unerreichbar. Ja noch mehr. Selbst wenn man mit einer einzigen Zelle arbeitet, wird man finden, daß deren (in ein und demselben Nährboden

aufgewachsene) Tochterzellen untereinander verschieden sind; bei der einen ist diese, bei einer anderen eine zweite erblich überkommene Eigenschaft, welche in der Mutterzelle latent war, zur Entfaltung gelangt. Dies zu betonen ist notwendig; denn nur zu oft kommt es vor, daß der angehende Jünger in der Hefenzüchtung alles Vertrauen auf 5 sein Können aufgeben zu müssen glaubt, wenn er bemerkt, daß eine von ihm nach allen Regeln der im 5. Kapitel zu besprechenden Einzell-Kultur



Fig. 7. Carlsberg Unterhefe Nr. 1 Hansen.
Vegetation in Würze bei 7,5° C aus einer Aussaat von Zellen einer Zucht in Saccharoselösung herstammend, welche ein Jahr bei gewöhnlicher Zimmertemperatur gestanden hatte. — Vergr. 1000. Nach Hansen.

zuverlässig aus einer einzigen Zelle hergestellte Reinzucht dann als aus Zellen von mehr oder minder großer Verschiedenheit in Gestalt und Größe bestehend sich erweist. Derartige Variabilität ist ja gar nichts Besonderes, sondern kommt bei den Bakterien und allen Lebewesen 5 überhaupt, und zwar in keinem geringeren Grade als bei den Hefen, vor. Innerhalb der Grenzen jedoch, welche durch die angedeutete Schwierigkeit der Regulierung gegeben sind, wird ein und dieselbe Art unter den gleichen Bedingungen annähernd gleiche Zellgestalten, sagen wir z. B. der Bodensatzhefe des Cerevisiae-Typus, aufweisen.

10 Als ein Beispiel der **Aenderung der Zellgestalt** unter dem gemeinsamen Einflusse der Temperatur und des Nährbodens mag hier die Beobachtung Hansen's an einer Zucht der *Carlsberg Unterhefe No. 1* angeführt werden, also derselben Art, mit welcher er im Jahre 1883 das Reinzuchtsystem in die Gärungsindustrie, und zwar in die Brauerei 15 Alt-Carlsberg bei Kopenhagen, eingeführt hat. Die Züchtung wurde in Würze bei 7,5 ° C vorgenommen; die Aussaat stammte aus einer Zucht in 10-proz. Saccharoselösung, welche ein Jahr bei Zimmertemperatur gestanden hatte. Die daraus dann hervorgegangenen Zellgestalten sind in der *Fig. 7* auf Seite 9 abgebildet. Deren Vergleichung mit der 20 folgenden *Fig. 8* auf Seite 11 wird den Unterschied leicht erkennen lassen.

Hansen (8) hat ferner gezeigt, wie auch die Temperatur allein als gestaltgebender Faktor auftreten kann. Durch Züchtung untengenannter Arten in Würze in der Nähe des Temperatur-Maximums für das Wachs- 25 tum, traten morphologische Charaktere hervor, durch welche sie in zwei Gruppen gesondert werden können: Die eine umfaßt die Arten *Sacch. cerevisiae I*, *Sacch. Pastorianus II* und *III*, *Sacch. ellipsoideus I* und *II* und *Sacch. Marxianus*; die zweite Gruppe besteht aus *Sacch. Pastorianus I* und Weinhefe *Johannisberg II*. Die zu der ersten Gruppe gehörenden 30 Arten entwickeln Vegetationen, welche aus runden und ovalen Zellen bestehen; *Sacch. Pastorianus II* und *III* haben also bei den hohen Temperaturen vollständig ihre Gestalt geändert, und bei den übrigen Arten ist das für die Gruppen *Sacch. cerevisiae* und *Sacch. ellipsoideus* Typische in der Gestalt in hoher Entfaltung ausgeprägt worden. Unter 35 den entsprechenden Umständen entwickeln dagegen die zwei Arten aus der zweiten Gruppe, *Sacch. Pastorianus I* und Weinhefe *Johannisberg II*, wurstförmige und langgestreckte Zellen. *Sacch. Pastorianus I* ist also in dieser Beziehung ganz verschieden von *Sacch. Pastorianus II* und *III*, und rücksichtlich *Johannisberg II* hat eine Umbildung der vor- 40 herrschenden typischen Gestalt stattgefunden. Diese Art ist eine echte Weinhefe und schließt sich sonst nahe an *Sacch. ellipsoideus I* und *II* an, mit welchen sie auch in der Gestalt der Zellen übereinstimmt, wenn die Züchtung bei gewöhnlicher Zimmertemperatur oder in der Nähe des Optimums unternommen wird. Während der Züchtung bei den hohen 45 Temperaturen wurde also die Gestalt ihrer Zellen ganz verschieden von denen der letztgenannten zwei Arten.

Wir haben im Obenstehenden schlagende Beweise dafür, wie bedeutungslos die Zellgestalt ist, wenn sie für sich allein zur Charakterisierung der Arten benutzt wird. Auffälligerweise geschieht dies aber 50 auch heute noch in gewissen botanischen Werken, in denen man noch immer Reess folgt und ganz und gar die Ergebnisse der experimentellen Forschung in der Gärungsphysiologie und in der Gärungstechnik bei Seite läßt.

An dieser Stelle wird es auch angezeigt sein, hervorzuheben, daß es ein großer Irrtum ist, wenn man im allgemeinen an der Gestalt der Zellen wilde Hefe (Krankheitshefe) von Kulturhefe unterscheiden zu können glaubt. Derjenige, welcher beständig ein und dieselbe Kulturhefe vor Augen hat, bekommt selbstverständlich zuletzt eine solche 5 Uebung in dem Erkennen der verschiedenen Gestalten, unter denen seine Kulturhefe auftritt, daß er wohl in der Regel es entdecken wird, wenn etwas Fremdes sich eingeschlichen hat; aber das ist auch das Ganze. Ob dieses Fremde eine wilde Hefe oder eine fremde Kulturhefe ist, kann er nicht durch eine einfache mikroskopische Untersuchung entscheiden. 10 Hierzu sind andere Untersuchungen erforderlich, von denen im folgenden gesprochen werden soll.

Daß zwei einander nahestehende Arten nichtsdestoweniger mit Hilfe der Gestalt der Zellen unter normalen Züchtungsverhältnissen voneinander unterschieden werden können, möge durch die nachstehenden 15 zwei Figuren erläutert werden. Beide veranschaulichen Proben aus der Bodensatzhefe in einer Zucht in Bierwürze am Ende der Hauptgärung. *Fig. 8* zeigt, wie schon zuvor gesagt, die *Carlsberg Unterhefe No. 1.*



Fig. 8.
Carlsberg Unterhefe No. 1 Hansen.
Zellen aus der Bodensatzhefe zu Ende der Hauptgärung. — Vergr. 1000.
Nach Hansen.

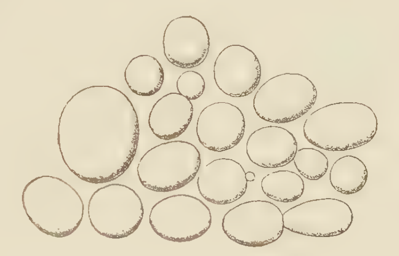


Fig. 9.
Carlsberg Unterhefe No. 2 Hansen.
Zellen aus der Bodensatzhefe zu Ende der Hauptgärung. — Vergr. 1000.
Nach Hansen.

Kennzeichnend für diese Bierhefe ist das Vorherrschen der eiförmig zugespitzten Zellgestalten. Die rein kugeligen treten stark zurück. Und 20 nur sehr selten findet sich auch eine gestreckte Zelle. Die in *Fig. 9* abgebildete *Carlsberg Unterhefe No. 2* hingegen zeichnet sich vor jener durch die bessere Rundung ihrer Zellen und durch das Auftreten außergewöhnlich großer Zellen, sogenannter Riesenzellen, aus, von denen eine am Rande des Bildes, vom Beschauer aus links, zu sehen ist. Das 25 Auftreten solcher Riesenzellen ist bei manchen Arten besonders auffallend und dann ein Merkmal.

Bei der oben gegebenen Beschreibung der Zellgestalten der Bodensatzhefe und der Sonderung aller Hefen danach in drei Gruppen war vorausgesetzt worden, daß die der Betrachtung unterzogenen Proben 30 aus frischen Zuchten genommen waren, d. h. aus solchen, in denen die Hauptgärung eben vorüber und die am Grunde der Flüssigkeit liegende Hefenernte vor kurzem erst fertig geworden ist. Anders hingegen ist das Bild der Zellen eines Dépôts, welches schon durch längere Zeit unter der ausgegorenen Flüssigkeit gelegen hat, also in alten Zuchten 35 des Laboratoriums oder im Geläger. Mit diesem letzteren Ausdruck wird in der Praxis der Brauerei der Hefenabsatz belegt, welcher sich im Lagerfaß ansammelt und also aus Zellen besteht, welche die ganze

Lagerzeit (oft viele Monate hindurch) der Einwirkung des darüber stehenden Bieres ausgesetzt waren. Unter solchem Einflusse entstehen viele gestreckte (pastoriane) Zellgestalten selbst bei solchen Stämmen, welche auf Grund der Gestalten ihrer frischen Satzhefe zum ausgeprägten 5 Cerevisiae-Typus gehören. Dies zu wissen ist für den Anfänger nützlich, damit er nicht verzage, wenn er das Geläger eines Fasses, dessen Inhalt mit einer von ihm gelieferten Reinhefe vergoren worden ist, nach geschehener Entleerung nun einer mikroskopischen Untersuchung unterzieht und reich an Zellen befindet, welche dem verdächtigen Pastorianus-10 Typus angehören.

§ 3. Die Vegetation an der Oberfläche von Flüssigkeiten.

Wir gehen jetzt zu der anderen Wuchsform über, unter welcher die Saccharomyceten in Nährflüssigkeiten auftreten, das ist die Hautbildung.

15 Die Hautbildung an der Oberfläche gärender Flüssigkeiten ist eine allgemein verbreitete Erscheinung, sie tritt bei vielen verschiedenen mikroskopisch kleinen Pilzformen auf. Da man in früheren Zeiten nicht mit Reinkulturen arbeitete, haben sich die damals gemachten Beobachtungen oft auf solche Hautvegetationen bezogen, welche gemeinschaft-20 lich von mehreren verschiedenen Arten, sowohl Saccharomyceten als anderen Mikroorganismen, aufgebaut waren. Mit Hansen (3) fing auch auf diesem Gebiete ein exaktes Studium an. Es waren namentlich die schon im Vorhergehenden erwähnten sechs Arten (*Sacch. cerevisiae I, S. Pastorianus I—III, S. ellipsoideus I—II*), mit denen er seine Versuche 25 im Jahre 1886 anstellte. Er zeigte, daß die Bedingungen für die Hautbildung einer *Saccharomyces*-Vegetation die folgenden sind: ein reichlicher Zutritt von Luft und eine ziemlich hohe Temperatur, indem die Vegetation der Ruhe überlassen wird.

Wir haben im vorhergehenden erwähnt, daß einige Arten sofort 30 nach der Aussaat bei günstiger Temperatur eine Haut bilden und daß letztere ihre Hauptwuchsform ist. Diese Haut hat aber ein anderes Aussehen als jene, welche bei den meisten Saccharomyceten erst nach längerem Stehenlassen gebildet wird. Während erstere öfters gefaltet und runzelig ist und ein mattes Aussehen besitzt, von den zwischen 35 den Zellen eingeschlossenen Luftblasen herrührend, ist letztere schleimig und glatt.

Ausgangspunkt für diese Hautbildung sind Zellen, welche nach Beendigung der die Nährlösung in steter sanfter Bewegung erhaltenden Gärung auf der Oberfläche der Flüssigkeit verblieben sind, dank ent-40 weder einer an der Zellhaut haftenden fettigen Absonderung ihrerseits, oder einer eiweißartigen oder harzigen Ausscheidung aus dem Nährboden, welche auf diesem schwimmt und so jene vor dem Untersinken bewahrt. Gute Gelegenheit sich oben zu erhalten ist an jenen Stellen, an denen der Flüssigkeitsspiegel die Wand des (runden) Zuchtgefäßes 45 trifft. An diesen Stellen wird so auch am raschesten die Entwicklung der Haut zu bemerken sein, und zwar in Gestalt eines weißlichen Ringes, welchen man als **Hefenring** oder auch **Hautring** zu bezeichnen pflegt. In manchen Fällen ist dieser zunächst kein vollständiger, sondern es ist an dessen Stelle eine Reihe von Flecken, also von Zellkolonien, 50 zu sehen, welche aber nach und nach, bei fortschreitender Vergrößerung,

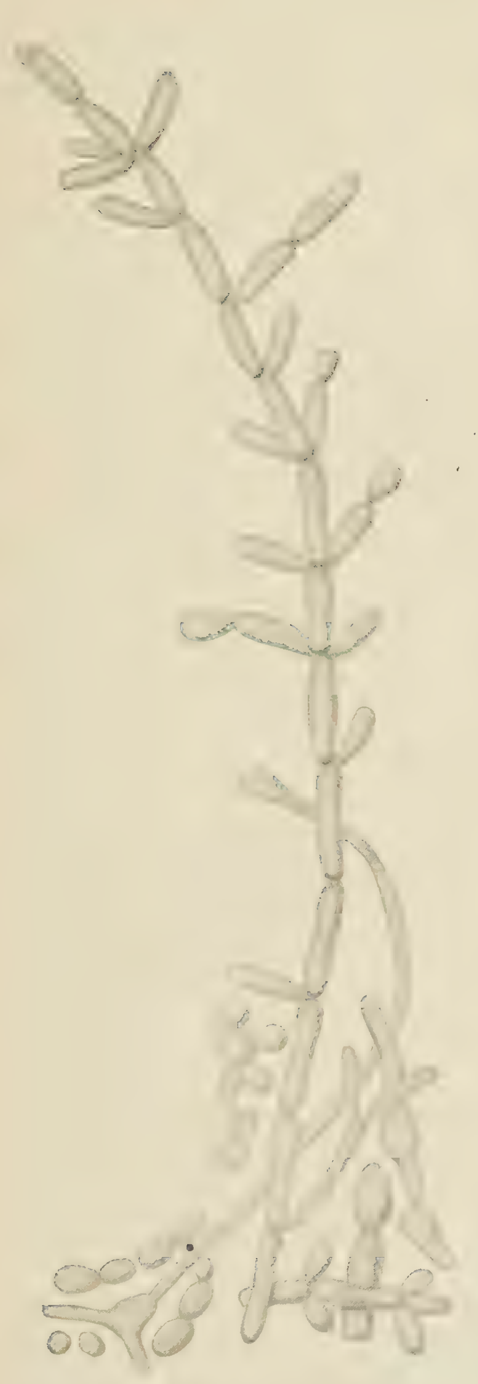


Fig. 10. Saccharomyces ellipsoideus I Hansen.
Zellen und Zellverbände aus der Haut einer alten Zucht in Bierwürze. — Vergr. 1000. Nach Hansen.

einander treffen und zu einem geschlossenen Ringe zusammenwachsen. In anderen Fällen wieder ist die Ringbildung überhaupt schwach und es geht die Hautbildung von kleinen Kolonien („Hefeninselchen“) aus, welche auf dem Flüssigkeitsspiegel selbst entstanden sind. Die Mächtigkeit, welche die Haut erreicht, ist unter gleichen Bedingungen je nach der Hefenart verschieden stark.

Die **Gestalt der Zellen,** aus denen die Haut (und auch der Hefenring) aufgebaut ist, unterscheidet sich im allgemeinen von jener der Bodensatzzellen durch größere Längenentfaltung (bis zu 150 μ und mehr) bei oft geringerer Breitenabmessung, als sie den zugehörigen Satzhefenzellen zukommt. Mehr oder minder reichliche Verzweigung ist das zweite Hauptmerkmal. Die *Fig. 10* gibt davon ein Beispiel.

Die **Zeitdauer,** binnen welcher man das Eintreten von Hautbildung eben schon erkennen kann, ist unter sonst gleichen Bedingungen bei verschiedenen Arten verschieden groß und um so beträchtlicher, je niedriger die Temperatur ist, bei welcher die Zuchten gehalten werden.

Die **Temperaturgrenzen** für die Hautbildung bei jenen sechs Arten befand Hansen (3) wie aus der Tabelle auf S. 14 zu ersehen ist.

Von diesen sechs Arten zeichnet sich besonders *Sacch. ellipsoideus II* in betreff des Zeitpunktes für die Entwicklung der Haut aus; er hat schon nach ca. 10 Tagen bei 22—23° C eine sehr kräftige Haut hervorgebracht. Die anderen fünf Arten brauchen dazu eine viel längere Zeit.

Die Temperaturgrenzen sind also hier, und das trifft auch für alle übrigen daraufhin ge-

	Temp.-Maximum	Temp.-Minimum
Sacch. cerevisiae I	33—34° C	6—7° C
Sacch. Pastorianus I, II u. *III*	26—28° „	3—5° „
Sacch. ellipsoideus I	33—34° „	6—7° „
Sacch. ellipsoideus II	36—38° „	3—5° „

prüften Arten zu, enger als jene, innerhalb welcher noch Gärwirkung und Sproßtätigkeit sich vollziehen kann. Sie ist somit auch von dem Lagerkeller der untergärigen Brauereien ausgeschlossen, in welchem die Temperatur, wenn irgend möglich, zwischen 0° und 2° gehalten wird. Daß die Größe der bis zum Eintreten merklicher Hautbildung verfließenden Zeitdauer, wie auch die Reichlichkeit jener, sehr stark von den Züchtungsbedingungen (Zusammensetzung der Nährlösung, insbesondere also auch die Art ihrer Sterilisierung, Ausmaß der Lüftung etc.) abhängt, ist auch schon durch Hansen bemerkt und durch spätere Beobachter, so z. B. durch H. Will (4), durch R. Aderhold (1) u. a., dann bestätigt worden.

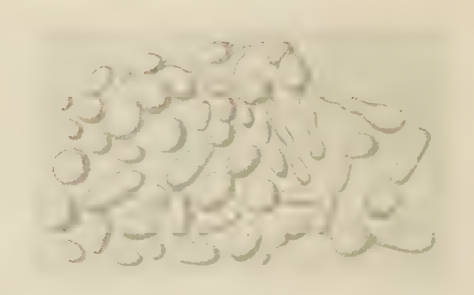


Fig. 11. Saccharomyces Pastorianus II Hansen. Zellen der bei 20—28° C auf Bierwürze herangezüchteten Häute. — Vergr. 1000. Nach Hansen.

Besonderheiten der Gestalt der Hautzellen können in manchen Fällen ein Merkmal zur Unterscheidung der Arten abgeben. An *Sacch. Past. II* und *Sacch. Past. III* läßt sich dies sehr schön erkennen und zugleich ein neues Beispiel für die Abhängigkeit der Zellgestalt von der Temperatur gewinnen. Auf Grund der Gestalt der Zellen der Satzhefe könnten diese zwei Arten kaum unterschieden werden; denn diese ist bei jeder der beiden ziemlich übereinstimmend mit der in *Fig. 6* abgebildeten von *Sacch. Past. I.* Das Gleiche gilt für die in den *Fig. 11* und *12* abgebildeten Elemente solcher Häute, welche bei 20—28° C herangewachsen sind. Anders wird es, wie Hansen (3) gezeigt hat, wenn wir jene zwei Arten bei 13—15° C haben Häute bilden lassen. Dann zeigt sich ein sehr starker Unterschied darin, daß viele der Hautzellen des *Sacch. Past. III* als sehr stark gestreckt (*Fig. 13*), langschläuchig und mit Seitensprossen versehen sich erweisen, während hingegen die Hautzellen des *Sacch. Past. II* auch bei dieser Temperatur (*Fig. 14*) so ziemlich jenen gleich sind, welche bei 20—28° heran-

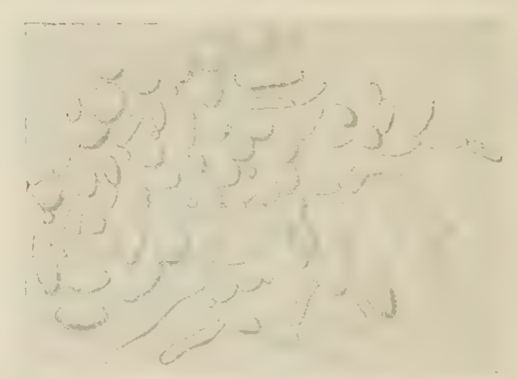


Fig. 12. Saccharomyces Pastorianus III Hansen. Zellen der bei 20—28° C auf Bierwürze herangezüchteten Häute. — Vergr. 1000. Nach Hansen.

gewachsen waren, also nur kurz wurstförmig oder sogar kugelig. Vorausgesetzt ist dabei, daß wir junge Häute zum Gegenstande der Untersuchung genommen haben. In sehr alten hingegen treten auch bei *Sacch. Past. II* dann gestreckte Zellen wie bei *Sacch. Past. III* auf. Aehnliche Verhältnisse herrschen in dieser Beziehung zwischen *Sacch. ellipsoideus I* und *Sacch. ellipsoideus II*.

Fig. 13. Saccharomyces Pastorianus III Hansen.
Zellen der bei 13—15° C auf Bierwürze herangewachsenen Haut. — Vergr. 1000. Nach Hansen.

Die Fähigkeit, sich auf der Oberfläche einer geeigneten Nährlösung in Gestalt einer Haut zu entwickeln, ist, wie schon oben gesagt, eine allgemeine Eigenschaft fast aller Sproßpilze, sowohl der Saccharomyceten als der Nicht-Saccharomyceten. Von diesen letzteren werden wir im Fünften Abschnitte unter dem Gattungsnamen *Mycoderma* eine besondere Gruppe kennen lernen, deren Arten weit verbreitet sind und spontan auf Wein oder Bier, wenn diese offen an der Luft stehen gelassen werden, in Gestalt einer sehr rasch heranwachsenden, faltigen Hautdecke auftreten, welche von den Praktikern als **Kahmhaut** bezeichnet wird. Diesen Namen hat man dann auch auf die Hautbildungen des *Saccharomyces* übertragen, was aber besser vermieden werden sollte, weil der Anfänger dadurch irregeführt werden könnte. Wir reden also hier nur von Hautbildungen. Als sehr luftbedürftige Wesen wachsen die Mycodermen normalerweise nur an der Oberfläche der Nährlösung als Haut. Sie vermögen durch dieses Verhalten bei Versuchen über die Hautbildung der echten Hefen sehr störend zu wirken, wenn diese nicht in Reinzucht, sondern verunreinigt mit dem, wie gesagt, weit verbreiteten *Mycoderma* verwendet werden. Aus solchem Grunde entspringendes Bedenken ist nun nicht bloß gegen die Angaben des ersten Beobachters der Hautbildung bei echten Saccharomyceten, nämlich Reess, sondern auch gegen Pasteur (3) zu erheben. Dieser bezeichnete im Jahre 1876 die Zellen der auf der Oberfläche der ausgegorenen Würze nach einiger Zeit sich entwickelnden Haut als a e r o b i s c h e oder S c h i m m e l h e f e

Er gelangte zu keiner Entscheidung zwischen seinen beiden Meinungen, von denen die eine dahin ging, daß diese Wuchsform wirklich für einen besonderen (nämlich den aerobischen) Entwicklungszustand der am Grunde der vergorenen Flüssigkeit liegenden Bierhefe zu halten sei, 5 während die andere hingegen diese als aus fremden Zellen hervorgegangen erachtete, welche schon der Aussaat unerwünschterweise beigemengt gewesen wären. Entscheidung haben auch auf diesem 10 Gebiete erst die durch HANSEN angestellten Untersuchungen an Reinzuchten bringen können.

Die Frage der Umwandelbarkeit der Unterhefe in 15 Oberhefe und umgekehrt wird von den eben gemachten Darlegungen ebenfalls gestreift. PASTEUR war der Meinung, daß die „aerobischen“ Zellen, aus 20 denen die Haut bestand, welche nach beendigter Hauptgärung in seinen mit (unreiner!) untergäriger Hefe beimpften Zuchten sich entwickelt hatte, fähig 25 wären, nun in neuer Nährlösung eine Obergärung durchzuführen. Er gab auch ein Rezept an, nach welchem der Brauer solche ungewollte Umwandlung seines 30 Zeuges verhindern könne. HANSEN ist später dann dieser theoretisch und praktisch wichtigen Frage näher getreten und hat festgestellt, daß die Nachkommenschaft von Häuten aller von ihm daraufhin geprüften Unterhefen in frischer Nährlösung immer wieder nur Unterhefenzellen entwickeln und Untergärung erregen, 35 und zwar auch dann, wenn man sie bei einer Temperatur (26°) beließ, welche dem Verlauf der Obergärung sehr günstig ist. Alle Versuche, Oberhefe in Unterhefe umzuwandeln oder umgekehrt, sind übrigens vergebens gewesen.



Fig. 14. Saccharomyces Pastorianus II HANSEN.
Zellen der bei 13—15° C auf Bierwürze herangewachsenen Haut. — Vergr. 1000. Nach HANSEN.

Die einzelnen **Stufen der Entwicklung der Haut** sind durch 40 H. WILL (4) an vier Arten von untergäriger Bierhefe näher erforscht worden. Das Folgende ist seiner Abhandlung entnommen. Die durch schwimmende Eiweißflöckchen und Reste von Kräusenbestandteilen zurückgehaltenen und dort schwebend erhaltenen Zellen, von denen die Entwicklung der Hefeninselchen ihren Ausgang nimmt, unterscheiden 45 sich zunächst in keiner Weise von denen der Bodensatzhefe. In der Folge jedoch bemerkt man, daß sie Tochterzellen hervortreiben, welche vor allem dadurch auffallen, daß sie, wie eine Vergleichung der *Fig. 15* mit der *Fig. 16* erkennen läßt, im Gegensatz zu dem entsprechenden Verlaufe bei der Sprossung der Satzhefe nicht einzeln oder zu zweien, 50 sondern gleichzeitig zu mehreren an ein und derselben Mutterzelle hervorsprossen. Sie sind zudem auch wesentlich kleiner (z. B. nur 7 μ gegen 10 μ der Dépôtzellen) und oval oder wurstförmig und bilden ihrerseits wieder ähnliche Tochterzellen, welche alle miteinander in Ver-

band bleiben. Mit diesen Zellen ist eine neue und besondere Generation herangewachsen. WILL bezeichnet sie als erste Generation der echten Hautzellen; denn mit deren Entstehen beginnt die Bildung der Haut. Neben diesen treten bald aber auch noch andere Zellen auf, welche durch beträchtlich größere Dicke ihrer Membran und reichen 5

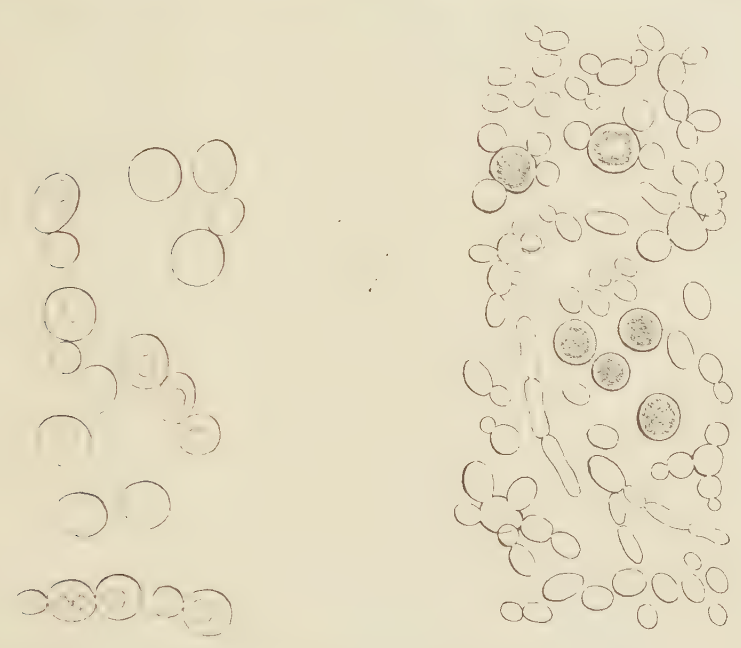


Fig. 15. Zellen der Bodensatzhefe aus einer Zucht in Würze von WILL's Bier-Unterhefe Stamm 93. — Vergr. 750. Nach WILL.

Fig. 16. Hautzellen erster Generation und Dauerzellen aus der Haut einer Zucht in Würze von WILL's Bier-Unterhefe Stamm 93. — Vergr. 750. Nach WILL.

Gehalt an Glycogen und Fett sich auszeichnen und als wahre **Dauerzellen** sich erweisen, und zwar sowohl durch ihren anatomischen Bau, als auch durch ihr physiologisches Verhalten; denn sie allein sind in sehr alten Zuchten, in denen alle übrigen Zellen der Bodensatzhefe und der Haut schon abgestorben sind, noch lebend und entwicklungsfähig. 10 Ueber das verschiedenartige Verhalten der Oeltröpfchen dieser Zellen einerseits und jener der Fetttröpfchen der Zellen der Bodensatzhefe andrerseits gegen konzentrierte Schwefelsäure bringt der § 16 auf S. 76 nähere Angaben. Der Hefenring, welcher ungefähr gleichzeitig heranwächst, ist an solchen Dauerzellen ganz besonders reich. Sie treiben 15 bald sehr langgestreckte, wurst- oder schlauchförmige Zellen hervor, welche ihrerseits sich ebenso verhalten und auch seitlich derartige Tochterzellen ansetzen, so daß also reichgegliederte Verbände von der in *Fig. 10* auf S. 13 veranschaulichten Art des Aufbaues heranwachsen. Deren Glieder sind durch WILL als Hautzellen zweiter Generation 20 bezeichnet worden. Je älter die Haut wird, um so üppiger entfalten sich diese und um so mehr treten die Hautzellen erster Generation zurück. Zu einem späteren Zeitpunkte werden in jenen gestreckten

Zellen ab und zu, bei verschiedenen Species verschieden reichlich, **Querwände** gebildet. Solche sind jedoch, nebenbei bemerkt, außer in den Hautzellen auch in Sproßverbänden zu finden, welche aus Dauerzellen, die man in Würze hat auskeimen lassen, entstanden sind. Die *Fig. 17* gibt davon ein Bild.

Bei farbigen Nährböden, wie Bierwürze und Wein, ist mit dem Vorschreiten der Entwicklung der Haut ein Verblassen, also Verschwinden des farbigen Bestandteiles, verbunden. Das tiefe Braun einer Würze kann so langsam in Strohgelb übergehen.

Auch durch ihr **chemisch-physiologisches Verhalten** unterscheiden sich die Zellen der Haut stark von denen der Bodensatzhefe. Diese letzteren entwickeln sich noch bei einer äußerst geringen Sauerstofftension und verlegen ihre Haupttätigkeit auf die Spaltung der Zuckerarten. Der Stoffwechsel der Hautzellen hingegen ist an die Verfügbarkeit sehr reichlicher Mengen von Sauerstoff unerläßlich geknüpft. Sie oxydieren, zufolge der Ergebnisse der durch B. Raýmann und K. Kruis (1) darüber angestellten Untersuchungen, den Alkohol der darunter stehenden vergorenen Nährlösung zu Kohlensäure und Wasser und bauen deren Eiweißkörper bis zu Amiden und Ammoniumsalzen organischer Säuren ab. Ameisensäure und Valeriansäure werden auch gebildet. An die Stelle der Gärwirkung bei der Bodensatzhefe ist also hier die Atmungstätigkeit in den Vordergrund getreten.

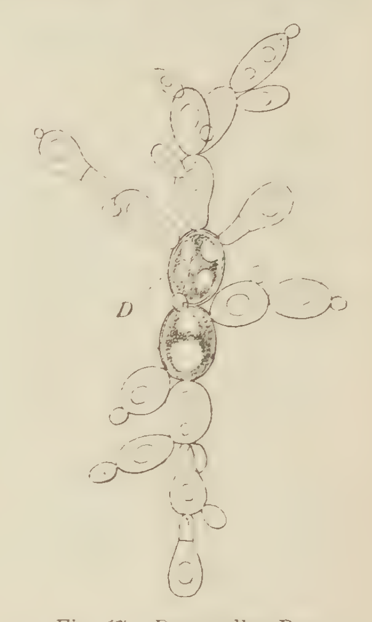


Fig. 17. Dauerzellen-Paar, aus dem Hefenring einer sechs Monate alten Zucht von Bier-Unterhefe Stamm 2 der Münchner Station in Würze, ausgekeimt in einem Tropfen Würze auf dem Objektträger unter dem Mikroskope bei 10° C in 64 Stunden zu einem reich entwickelten Sproßverband. Drei von dessen Gliedern haben je eine Querwand im Innern aufgerichtet. Fast alle Zellen mit einer oder zwei Vakuolen, in den zwei Dauerzellen (*D*) sogar noch mehr. — Vergr. 750. Nach Will.

In frische Nährlösung gebracht und untergetaucht gehalten, bringen die Hautzellen dort Vegetationen hervor, welche schließlich dann so wie die normale Bodensatzhefe sich verhalten. Die Geschwindigkeit der Umbildung der Gestalt und der Umstimmung des physiologischen Charakters ist bei den verschiedenen Hefenarten verschieden groß. Nach Will's (4) Untersuchungen hatten bei manchen die den Hautzellen zukommenden Merkmale auch noch den aus jenen zunächst hervorgehenden Generationen an, und es kann in besonders ausgeprägten Fällen sogar mehrerer Umzüchtungen, d. h. also wiederholter Uebertragung der Ernte in frische Nährlösung, bedürfen, um eine Bodensatzhefe zu gewinnen, welche in jeder Hinsicht dann genau gleich jener sich erweist, von welcher die zuerst übertragenen Hautzellen abstammen. Man beachte darüber z. B. auch eine Beobachtung von Ed. Kayser (3). Die nähere Betrachtung dieser Verhältnisse unter dem Gesichtspunkte der Lehre von der Variation wird im 8. Kapitel vorgenommen werden. Wenn man eine reine Hefe zum Gebrauch in der Praxis herstellen soll, wird man

selbstverständlich seinen Ausgangspunkt von einer normalen Bodensatzhefe und nicht von einer Hautvegetation nehmen. Ist für die Zwecke einer zu erledigenden Hefenbestellung aus irgend welchem Grunde nur eine solche Zucht verfügbar, welche schon eine Haut angesetzt hat, so darf man jene nicht gleich in die größeren Vermehrungsgefäße übertragen, sondern muß sie zuerst auffrischen, d. h. eine Ueberimpfung herstellen, von dieser dann, sobald kräftige Entwicklung eingetreten ist,

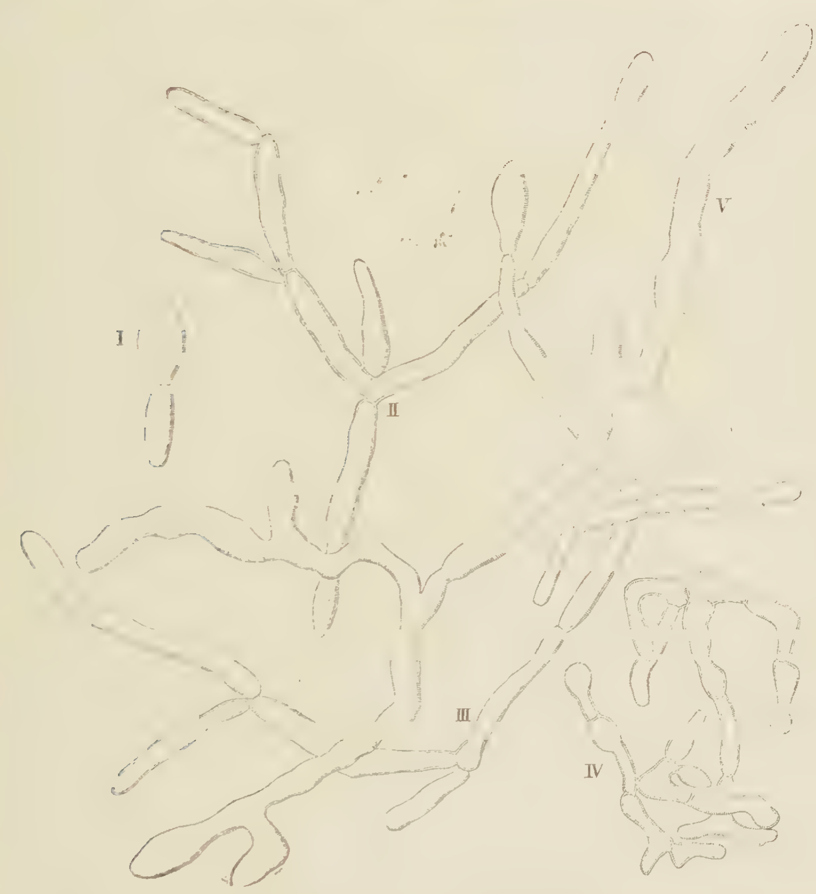


Fig. 18. Saccharomyces Ludwigii Hansen.
Mycelbidung aus alten Zuchten in Kirschsaft und in Hefenwasser. *I* Eine Hefenzelle mit einem wurstförmigen Sproß; letzterer ist durch eine Querwand gegen die Mutterzelle abgegrenzt. *II—IV* Verzweigtes Mycelium mit stark entwickelten Querwänden. *V* Eine verzweigte Mycelzelle ohne Querwände. — Vergr. 1000. Nach Hansen.

wieder eine frische Nährlösung beimpfen und so je nach Umständen mehreremal, bis man annehmen kann, daß die nächsten Nachkommen der mit der zuerst überimpften Bodensatzhefe mitgegangenen Hautzellen ganz unterdrückt sind. Dem Anfänger kann gar nicht eindringlich genug anempfohlen werden, die Hefenzüchtungsarbeit nicht dann schon für beendigt zu halten, wenn die Reinzuchten hergestellt sind, sondern diese dann unablässig zu beobachten, zu prüfen und zu behüten.

Man darf das eben Gesagte jedoch nicht in dem Sinne auffassen, als ob die Hautzellen all die unliebsamen Veränderungen bewirkten, welche an den Bierhefen sich zeigen können. Nein, es spielen vielmehr hier noch andere Kräfte mit. Auch von dieser Seite her kommen wir, 5 wie schon oben angedeutet, auf das große Gebiet der Variation der

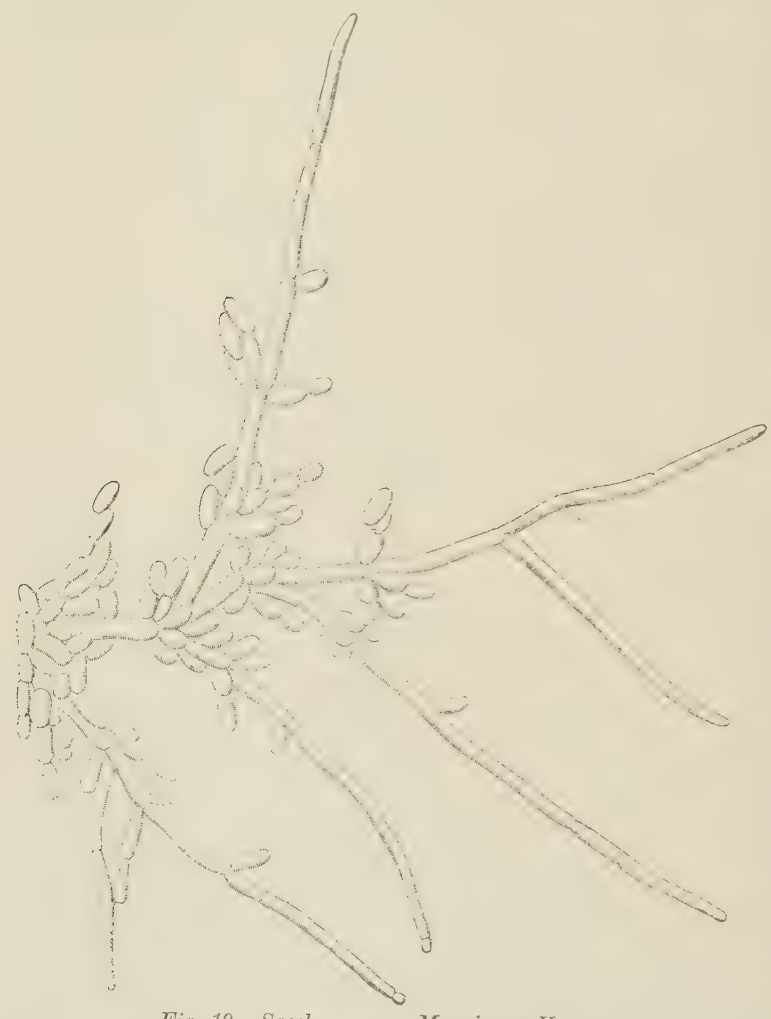


Fig. 19. Saccharomyces Marxianus Hansen.
Vegetation in Hefenwassergelatine. Züchtung in Böttcher's Kammer mit reichlicher Luftzufuhr bei gewöhnlicher Zimmertemperatur. — Vergr. 1000. Nach Hansen.

Hefenzellen, ein Gebiet, auf welchem Hansen durch ausgedehnte experimentelle Forschung uns zum Pfadfinder geworden ist, wie das 8. Kapitel zeigen wird. Es muß übrigens noch daran erinnert werden, daß Raýman und Kruis (1) auch mittelst solcher Anstellhefe, zu deren Heran-10 züchtung alte Hautzellen zum Ausgang gedient hatten, ein gutes Bier haben erzeugen können, welches von einem mit Hilfe von normaler Hefe hergestellten nicht zu unterscheiden war. Die Ergebnisse der Versuche,

welche Alb. Klöcker mit Hautvegetationen von *Carlsberg Unterhefe No. 1* und *No. 2*, *Sacch. cerevisiae 1* Hansen, Marientaler Hefe und Will's Stamm 2 ausgeführt hat, stimmen damit überein.

Durch Will's Beobachtungen wird man an die von den Brauern sehr gefürchtete Flughefe erinnert. Das sind Hefenzellen, welche 5 einen geringeren Durchmesser als die Satzhefen aufweisen, in der Flüssigkeit sich nicht absetzen, sondern, wie ihr Name besagt, darin schweben bleiben und also die Klärung nicht zu Ende kommen lassen. Nähere Angaben darüber sind im 8. Kapitel des V. Bandes zu finden.

Hansen (5) war der erste, welcher bei den Saccharomyceten ein 10 **Mycelium** nachwies, und zwar bei *Sacch. Marxianus* und *Sacch. Ludwigii*. Die *Fig. 18* auf S. 19 stellt eine solche Mycelbildung bei dem letztgenannten Pilze dar. Sie hatte sich bei der Züchtung in Kirschensaft und in Hefenwasser entwickelt. Die *Fig. 19* zeigt uns Mycelbildung bei der erstgenannten Art: hier war die Züchtung in Hefenwassergelatine 15 vorgenommen worden.

Solche Mycelbildungen sind außerdem durch andere Forscher beobachtet worden, so z. B. durch P. Lindner (1) und durch H. Will (4, 6). In der letzten Zeit hat Schiönning (3) bei dem von ihm entdeckten *Saccharomycopsis capsularis* die am stärksten ausgeprägte Mycelentwicklung 20 gefunden, die bis jetzt bei irgend einer zu der Familie der Saccharomyceten gehörigen Art nachgewiesen worden ist.

Lepeschkin (1) hat über Mycelbildung bei *Schizosaccharomyces mellacei* und *Schizosacch. Pombe* berichtet. Er ist der Meinung, daß bei diesen zwei Arten das Mycelium nicht eine normale Entwicklungsform ist, 25 sondern daß es nur durch eine Umbildung der Zellen entstehe. Die Bedingungen dafür sind nicht bekannt.

Eine Mycelbildung beobachtete Hansen (7) auch bei *Sacch. Ludwigii* bei der Auskeimung alter Sporen. Sonst wird die Mycelbildung gewöhnlich in alten Häuten oder überhaupt in alten Zuchten, und zwar 30 sowohl in flüssigen als auch auf festen Nährböden gefunden. In jungen Zuchten findet man sie nur ausnahmsweise, so bei den obengenannten *Sacch. Ludwigii* und *Saccharomycopsis capsularis*; letzterer bildet bei Züchtung auf Würze schon binnen zwei Tagen bei 25° C ein Mycelium. 35

§ 4. Die Vegetation auf festen Nährböden.

Wenn wir an der Oberfläche eines festen Nährbodens, z. B. Würzegelatine, ein wenig einer Vegetation von irgend einem *Saccharomyces* aussäen und dann bei günstiger Temperatur halten, bildet sich bald eine **Kolonie.** Die Zellen bleiben hier leichter in Verbindung miteinander 40 als in der Nährflüssigkeit, wo die geringste Bewegung des Gefäßes, in welchem sich die Zucht entwickelt, die Zellen voneinander wird trennen können. Bisweilen werden wir jedoch die Beobachtung machen, daß ein Teil einer Kolonie auf Nährgelatine sich losreißen kann; dies rührt aber in diesem Falle davon her, daß die Gelatine durch Einwirkung gewisser 45 in den Hefenzellen vorhandener Enzyme (s. d. 20. Kap.) verflüssigt wird, so daß die Zellen dadurch in eine Flüssigkeit gelangen, und das Verhalten wird dann dasselbe als ob die Zucht von vornherein in einer solchen angelegt worden wäre. In der Regel dauert es jedoch eine gewisse Zeit, ehe die Verflüssigung der Gelatine eintritt, und wir haben 50

gewöhnlich hinlänglich Muße, um das Aussehen der Kolonien zu betrachten, bevor diese Veränderung sich einstellt.

Die verschiedenen Hefenarten können auf Nährgelatine Kolonien von verschiedenem Aussehen erzeugen. Wir sagen „können", denn einer-5 seits ist es nicht immer der Fall, daß das Bild der Kolonien derselben Art konstant ist, selbst wenn immer die gleiche Nährgelatine benutzt wird; und anderseits können zwei verschiedene Arten auch auf der gleichen Nährgelatine in Kolonien von übereinstimmendem Aussehen sich entwickeln. Schon eine sehr geringe Aenderung in der Zusammensetzung 10 des Nährbodens genügt, um eine Aenderung in dem Aussehen der Kolonie hervorzurufen, ebenso wie auch der physiologische Zustand der Zellen, dann die Einwirkung der Temperatur und anderer Faktoren hier wie bei allen ähnlichen Zuchten eine große Rolle spielen.

Die ersten, welche das Aussehen der Kolonien auf festem Nährboden 15 als Artencharaktere bei Mikroorganismen benutzten, waren SCHROETER (1) und R. KOCH (1), und zwar in betreff der Bakterien (s. 22. Kap. d. I. Bds.). Schon im Jahre 1887 machte HANSEN (4) auf Unterschiede in dem Aussehen der Vegetationen der *Saccharomyces*-Arten aufmerksam, welche durch die Art des Nährbodens und durch die Höhe der Tempe-20 ratur hervorgerufen werden. So fand er, daß von seinen im Vorhergehenden besprochenen sechs Arten der *Sacch. ellipsoideus I* sich in Impfstrichen auf Würzegelatine bei 25° C dadurch als ganz verschieden von den übrigen fünf Arten erweist, daß die Oberfläche des Impfstriches bei ihm eine netzförmige Ausbildung annimmt, ferner, daß die 25 Strichzuchten von *Sacch. Pastorianus II* auf Hefenwassergelatine bei 15° C nach 16 Tagen Vegetationen mit glatten Rändern liefern, während sie bei *Sacch. Pastorianus III* unter den gleichen Züchtungsverhältnissen haarig sind. Er hebt die genannten Charaktere hervor, weil sie zur Unterscheidung einander nahestehender Arten dienen.

30 In seinen vergleichenden Untersuchungen an vier untergärigen Arten von Bierhefe, die er als Stamm 2, 6, 7 und 93 bezeichnet, hat WILL (5) Aufklärungen über das Wachstum dieser Arten auf festem Nährboden gegeben. Von Stamm 2, 6 und 93 sagt er, daß das Wachstum auf 10-proz. Würzegelatine im allgemeinen gleichartig ist und daß die aus 35 isolierten Zellen hervorgegangenen Kolonien sich nicht voneinander unterscheiden lassen. Dieselben besitzen, wie fast alle untergärigen Bierhefen, welche er im Laufe von 10 Jahren zur Reinkultur erhalten hat (mehrere 100 Nummern), schon in den ersten Entwicklungsstadien die typische „Maulbeerform" und behalten dieselbe auch längere oder 40 kürzere Zeit. Ganz verschieden von den genannten drei Rassen verhielt sich Stamm 7. Es war hier oft sehr schwierig, ja unmöglich, die Kolonien, abgesehen von den nur aus Riesenzellen bestehenden und solchen, welche diese in normaler Zahl enthielten, von denjenigen zu unterscheiden, welche sich aus wilder Hefe entwickelt hatten. Als ein 45 Hauptresultat seiner Untersuchungen gibt WILL an, daß die Kolonien einer und derselben Art auf dem gleichen festen Nährboden unter gleichen äußeren Bedingungen dennoch sehr verschieden sein können. Der Zustand der Zellen bei der Aussaat ist nämlich von größter Bedeutung. Im allgemeinen können von äußeren Faktoren, welche ihren Einfluß 50 geltend machen, die folgenden genannt werden: 1. Die Zusammensetzung der Nährlösung, in welcher sich die Hefe vor der Einsaat in das feste Substrat befand, 2. die chemische und physikalische Beschaffenheit des festen Substrates, 3. die Temperatur, 4. die Lüftung, 5. die Dicke der

Gelatineschicht und 6. der Feuchtigkeitsgrad. Die Verschiedenheit der Wachstumsform der Kolonien steht in einem sehr engen Zusammenhang mit den im Laufe der Entwicklung der Kulturen nacheinander auftretenden Generationen. Er hebt besonders hervor, daß eine Beimengung von Zellen der Haut in dem Aussaatmaterial einen starken Einfluß auf das Aussehen der Kolonie ausübt. Er unterscheidet 3 Typen der Wachstumsform der Kolonien: I. Regelmäßige Kolonien. Als solche bezeichnet er diejenigen, welche Linsen-, Kugel- oder Halbkugel- oder selbst Zapfenform besitzen. II. Unregelmäßige Kolonien mit regelmäßigem Kern. Der Kern ist wie beim I. Typus, die Randzonen sind unregelmäßig. Dieser Wachstumstypus tritt am häufigsten sekundär auf. Bei manchen Kolonien vom II. Wachstumstypus geht dieser später in den I. Typus über. III. Völlig unregelmäßige Kolonien. Alle Uebergänge vom II. zum III. Typus kommen vor. Ursprünglich streng regelmäßige Kolonien können durch sekundäres Wachstum völlig unregelmäßig werden, so daß die Regelmäßigkeit des Kernes völlig verwischt wird („Amöbenform“).

Mit dem Namen **Riesenkolonie** bezeichnet P. Lindner (1) solche Kolonien, welche in der Weise angelegt werden, daß ein Tropfen einer Kultur auf der Mitte der Oberfläche einer dicken Schicht Nährgelatine in einem Kolben ausgesäet wird, wonach die Kultur der Ruhe überlassen wird, bis eine große Kolonie sich entwickelt hat. Während die im vorhergehenden erwähnten Kolonien aus einer oder jedenfalls aus sehr wenigen Zellen herstammen, haben wir also hier Kolonien, welche von einer sehr großen Anzahl Zellen, oft vielen Tausenden, herstammen. Als besondere Vorteile dieser Züchtungsmethode hebt Lindner hervor, daß die Kulturen photographisch fixiert werden können. Er betont, daß ohne Photographie diese Kulturmethode allerdings auch nur von untergeordneter Bedeutung für die Wissenschaft wäre, denn die Kulturen sind vergänglich, und Worte reichen nicht aus, um uns von einem solchen Gebilde die richtige Vorstellung zu geben. Er fügt ferner hinzu, daß man nicht immer erwarten darf, daß geringe Differenzen zwischen den Hefenrassen immer gleich in der Kultur auf festem Nährboden zum Ausdrucke kommen, und daß die Erfahrung gelehrt hat, daß manchmal sogar recht verschiedene Hefen in gleichgeformten Vegetationen heranwachsen. Die Art und Weise, wie das Aussaatmaterial auf die Gelatine gebracht wird, kann sehr wohl die spätere Ausbildung der Kolonie beeinflussen.

Als Beispiele von Riesenkolonien verschiedener Arten mögen die auf *Tafel I* nach Lindner gegebenen Abbildungen dienen. Die *Fig. 1* dieser Tafel zeigt Hefe *Saaz* auf 10-proz. Saccharose-Hefenwasser + 6 Proz. Gelatine und *Fig. 3* dieselbe Hefenart auf 10-proz. Saccharose-Hefenwasser, das aber mit 12 Proz. Gelatine versetzt worden ist. *Fig. 2* und *Fig. 4* dieser Tafel zeigen Hefe *Frohberg* unter den entsprechenden gleichen Züchtungsverhältnissen. Der steigende Gelatinegehalt macht sich dadurch bemerkbar, daß die Kolonien eine gedrängtere Form annehmen und gleichzeitig auf ihrer Oberfläche ein trockenes, weißes Aussehen bekommen. Beim Vergleichen dieser Abbildungen ist der Unterschied zwischen *Saaz* und *Frohberg* deutlich zu erkennen. Die *Fig. 7—11* dieser Tafel stellen Kolonien der 5 Hansen'schen Arten vor. Die *Fig. 5* und *6* schließlich zeigen uns zwei Kolonien derselben Art, nämlich der Hefe *Saaz*; hier ist ein nicht geringer Unterschied in ihrem Aussehen ersichtlich.

Ausführliche Untersuchungen der von den früher erwähnten vier Brauereiunterhefen Stamm 2, 6, 7 und 93 gebildeten Riesenkolonien sind von Will (7) unternommen worden. Er gelangte zu dem Resultate, daß die ausgewachsenen Einzell-Kolonien, welche auf Seite 22—23 besprochen wurden, mit den Riesenkolonien im wesentlichen identisch sind. Ferner ist er der Meinung, daß die letzteren mit den Hautbildungen auf Nährflüssigkeiten übereinstimmen, indem er dieselben Zellformen in beiden Vegetationsgebilden fand. Die Temperatur übt auf die Wachstumsform der Riesenkolonien dieser vier Arten keinen wesentlichen Einfluß aus. Diese bleibt auf dem gleichen Substrat in den Hauptzügen bei allen Temperaturen, bei welchen die Riesenkolonien der vier Hefen vergleichend untersucht wurden, die gleiche. Die Form der Riesenkolonien war nach einer langen Reihe von Jahren — unter den gleichen Bedingungen, bei dem gleichen Aussaatmaterial und bei gleichmäßiger Behandlung desselben — bei zahlreichen inzwischen wiederholten Untersuchungen im wesentlichen immer wieder die gleiche.

Was im vorhergehenden von den Kolonien im allgemeinen gesagt worden ist, gilt selbstverständlich auch für diese Riesenkolonien. Die von ihnen abgeleiteten Charaktere sind in der letzten Zeit häufiger als diejenigen Charaktere benutzt worden, welche man durch Züchtung in Strichkulturen oder in gewöhnlichen Plattenkulturen bekommt. Es unterliegt keinem Zweifel, daß sie mit der von Lindner und Will hervorgehobenen Begrenzung ein nützliches Hilfsmittel zur Charakterisierung der Arten sind. Alle solchen Wuchs-Charaktere haben indessen nur denselben Wert, wie ihn z. B. das Aussehen eines Buchenwaldes in der Ferne zur Charakterisierung der Pflanzenspecies Buche hat. Ihnen allen Wert abzusprechen, wie dies van Hest (1) in der neuesten Zeit gemacht hat, heißt allzuweit gehen.

§ 5. Ascus- und Ascosporenbildung.

Die erste Beobachtung der Entstehung jener Gebilde in den Hefenzellen, welche wir heute als Ascosporen bezeichnen, war schon, wie im Vorhergehenden mitgeteilt, Th. Schwann (2) im Jahre 1839 geglückt. Nachdem dann im Jahre 1868 J. de Seynes (1) diese Gebilde etwas genauer beschrieben hatte, sah sie ein Jahr später auch M. Reess (1) in Zuchten auf Scheiben von gekochten Mohrrüben u. dgl. entstehen.

Experimentelle Untersuchungen über die Bedingungen, unter denen es zur Sporenbildung kommt, sind erst durch E. Chr. Hansen (2) in den Jahren 1882 und 1883 vorgenommen worden. Sie haben, von den allgemein biologischen Ergebnissen abgesehen, zu der wichtigen Erkenntnis geführt, daß wir an diesem Vorgang auch ein verläßliches Mittel für die bis dahin vergeblich versuchte Zerlegung des Genus *Saccharomyces* in seine Arten haben.

Die wichtigsten Resultate seiner Untersuchungen können in den folgenden Sätzen ausgedrückt werden: 1. Um eine kräftige Sporenbildung zu erreichen, muß die Probe aus jungen, gut genährten Zellen bestehen. 2. Die atmosphärische Luft muß reichlich zutreten können. 3. Die Unterlage muß feucht sein. 4. Die Temperatur muß eine ziemliche hohe sein; das Optimum der meisten Arten liegt in der Nähe von 25° C. Ferner 5. Die Zeitdauer, binnen welcher die Sporenbildung eintritt, ist eine Funktion der Temperatur. 6. Temperatur-Maximum und Temperatur-

Minimum sind die wichtigsten Temperatur-Bestimmungen zur Charakterisierung der Arten. 7. Zwischen diesen beiden Grenzwerten liegt das Optimum, dem das Minimum der Zeitdauer entspricht. 8. Für die Sporenbildung liegt das Temperatur-Maximum niedriger und das Temperatur-Minimum etwas höher als für die Sproßbildung. 5

In letzterem Satze hat HANSEN (8) ein für alle der Familie der Saccharomyceten zugehörigen Arten allgemein gültiges Gesetz ausgedrückt. Er stellte in dieser Richtung hin sehr umfassende Untersuchungen über das Verhalten der vegetativen und fruktifikativen Organe zur Temperatur an. (Siehe die Tabelle mit den Zeitangaben für die Sporenbildung 10 bei verschiedenen Temperaturen; in betreff der Sproßbildung sei auf das 5. Kapitel dieses Bandes verwiesen.) KLEBS hat den Satz HANSEN's als einen für die Pilze allgemein gültigen ausdehnen wollen. Dies läßt sich jedoch, wie die neuen Untersuchungen HANSEN's (8) über die Mucorineen dargetan haben, nur mit gewissen und zwar recht starken Ein- 15 schränkungen tun.

HANSEN (8) fand bei seinen Untersuchungen, daß besonders die Luftzufuhr ein überaus wichtiger Faktor ist. Alte Zellen machen in dieser Beziehung größere Ansprüche als die jungen Zellen. Um zu entscheiden, welcher der drei Bestandteile der atmosphärischen Luft: 20 Stickstoff, Kohlensäure und Sauerstoff, hier wirksam sei, stellte er besondere Versuche mit jeder dieser drei Gasarten an. Es zeigte sich dann, daß die Sporenbildung nicht eintrat, wenn die Züchtung in einer Atmosphäre von Stickstoff oder Kohlensäure vor sich ging; Sporen wurden nur dann gebildet, wenn die Zellen sich in einer sauerstoffhaltigen 25 Atmosphäre befanden. Es ist hieraus ersichtlich, daß der Sauerstoff ein absolut notwendiger Faktor für die Sporenbildung ist.

Wenn von anderen Seiten, so z. B. von KLEBS, hervorgehoben worden ist, daß Nahrungsmangel ein notwendiger Faktor zur Hervorrufung der Sporenbildung sei, so hat HANSEN (8) dargetan, daß dies nicht richtig 30 ist; es ist im Gegenteil die wohlgenährte Zelle, die am leichtesten und schnellsten Sporen bildet, was später auch durch BARKER (2) bestätigt worden ist. Ueber dieses Verhalten und über den Einfluß der Temperatur auf die Sporenbildung werden wir später noch mehr hören. Daß die Zeit, binnen welcher die Sporenbildung eintritt, eine Funktion der 35 Temperatur ist, bedarf nicht erst näherer Auseinandersetzung. Worauf aber nachdrücklich aufmerksam gemacht werden muß, das ist die in der Forderung 1 enthaltene Rücksicht auf den Zustand der Zellen; denn von diesem hängt es in erster Linie ab, ob und binnen welcher Zeit die Sporenbildung eintritt. Eine bestimmte *Saccharomyces*-Art, bei einer 40 bestimmten Temperatur gehalten, braucht dann verschieden lange Zeit zur Hervorbringung von Ascosporen, wenn der **Zustand der Zellen**, in physiologischer Hinsicht, ein verschiedener ist. Will man bei einer bestimmten Art nur Sporenbildung überhaupt hervorrufen, dann genügt es, wenn man die Zellen in ziemlich kräftigem Zustande dazu verwendet; 45 was durch vorhergehendes Uebertragen in frische Nährlösung erreicht wird. Anders liegt die Sache aber dann, wenn es sich darum handelt, für eine vorgelegte *Saccharomyces*-Art die Fixpunkte festzulegen, das heißt, zu bestimmen, welche Zeit bei dieser und bei jener Temperatur verstreicht, bis Sporenbildung zu bemerken ist. Dann hat man zu be- 50 denken, daß diese Zeitdauer eine Funktion nicht nur der Temperatur, sondern auch des physiologischen Zustandes der Zellen der betreffenden Species ist. Man wird somit, um den Einfluß jener feststellen zu können,

denjenigen des Zustandes ausscheiden müssen. Erfahrungsgemäß tritt die Sporenbildung dann sicher und am frühesten ein, wenn die Zellen auf dem Höhepunkt ihrer Sproß- und Gärtätigkeit angelangt sind. Darum verwenden wir die Zellen gerade in diesem Zustande. Dementsprechend ist für genaue Bestimmung der Fixpunkte die daraufhin zu untersuchende Probe folgender **Vorbehandlung** zu unterziehen: Die Probe wird in sterile Bierwürze eingesät und einige Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Von der gebildeten Satzhefe wird dann ein Teil in frische sterile Bierwürze übergeführt und diese dann 24 Stunden bei 25° C gehalten. Die neuerlich gebildete Satzhefe wird dann behutsam von der darüberstehenden Nährlösung so vollständig als möglich befreit und nun zur Anlegung der Sporenkultur verwendet.

Ein paar Beispiele mögen dartun, wie nötig es ist, auf den Zustand der Zellen Rücksicht zu nehmen. Das erste rührt von HANSEN selbst her und betrifft den *Sacch. Pastorianus I.* Dessen Zucht war zuerst einige Tage bei Zimmertemperatur geführt worden. Von der Satzhefe wurde, wie oben beschrieben, neuerlich übergeimpft und zwar in zwei Kölbchen. Davon wurde dann das eine 24 Stunden, das andere 48 Stunden bei 26—27° C gehalten, und hierauf wurden Sporenkulturen angelegt. Diese ergaben nachfolgende Zahlen für die Zeitdauer, binnen welcher Sporenbildung eintrat:

Sacch. Pastorianus I HANSEN.

Es trat Sporenbildung ein bei:	wenn vorher gezüchtet bei 26°—27° C durch:	
	24 Stunden	48 Stunden
	nach Stunden	
29° C	27	keine Sporenbildung
28°—27,5°	24	36
23,5°—23°	26	30
15°	50	54

Die durch 48 Stunden vorbehandelte Probe ließ Sporenbildung bei einer Temperatur (29°) vermissen, welche bei der normal behandelten solche hervorrief. Es scheint die durch die längere Gärdauer hervorgerufene Erhöhung des Alkoholgehaltes zu sein, auf deren Rechnung diese ungünstige Wirkung zu setzen ist. Das zweite Beispiel entnehmen wir den Untersuchungen ADERHOLD's (1) über deutsche Weinhefen. Die der Art *Müllheim* wurde in demselben konzentrierten Moste, teils 24, teils 36 Stunden bei 25—27° C kultiviert. In den Gipsblockkulturen bei 25—26° C mit der in dieser Weise erzeugten Hefe fanden sich bzw. Sporen nach 2—3 Tagen und keine Sporen, selbst nach 6 Tagen. Die besagte Abhängigkeit ist auch durch andere Forscher beobachtet worden, so z. B. durch H. MÜLLER-THURGAU (1).

Feuchte Unterlage und reichlichen Zutritt von Luft bieten wir einer Hefenkultur am besten auf dem schon durch ENGEL (1) angegebenen und durch HANSEN dann zweckmäßig abgeänderten **Gipsblock.** Es ist dies ein abgestutzter Kegel von ungefähr 3—4 cm Höhe. Er wird, unter Mithilfe einer (nicht einzufettenden) Blechform, aus einem aus 8 Raumteilen gepulverten, gebrannten Gipses und drei Teilen Wasser bereiteten Brei hergestellt. Nachdem der Block durch Auskochen in Wasser feucht geworden ist, wird er in einer zugedeckelten und in eine zwei-

fache Lage von Filtrierpapier eingehüllten Glasschale im Trockenkasten (bei 110—115° C durch 1—1½ Stunden) sterilisiert. Nach dem Erkalten wird auf die obere, schmälere Basis des Blockes die Aussaat aufgetragen. Gleich darauf gießt man behutsam soviel keimfreies (gekochtes) Wasser in die Schale ein, daß nach kurz andauerndem Zuwarten der Block nicht 5 bloß vollständig, und zwar von unten ausgehend, durchfeuchtet ist, sondern auch noch in einer Wasserschicht von ca. 1 cm Höhe steht. Der Deckel darf nicht dicht schließen, sondern soll zweckmäßig etwas ungleichmäßige Lagerfläche haben, um der Luft den Zu- 10 tritt nicht zu versperren. Die *Fig. 20* gibt von der Zusammenstellung eine Abbildung in ca. der Hälfte oder einem Drittel der natürlichen Größe. Man stellt nun den so besäten Block in seiner Schale mit Wasser 15 in den Thermostaten bei der in Betracht zu ziehenden Temperatur.

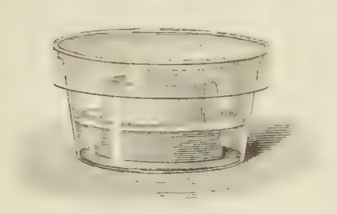


Fig. 20. Gipsblock-Kultur.

Auch die Art des Stoffes, aus welchem die feuchte Unterlage besteht, ist unter sonst gleichen Bedingungen von Einfluß auf die zur Bildung der Sporen erforderliche Zeitdauer. Weil die Gipsblöcke durch das nach 20 Beendigung des Versuches vorgenommene Reinigen mit Wasser nach und nach doch zerstört werden, hatte H. Wichmann (1) an deren Statt feste Blöcke aus Chamotte empfohlen. J. Chr. Nielsen (1) und Alb. Klöcker haben aber gezeigt, daß auf diesen die Sporenbildung viel langsamer eintritt als auf Gipsblöcken. Die zuerst durch H. Elion (1) 25 verwendeten Würfel aus Ton hingegen ließen ungefähr das gleiche Ergebnis erhalten wie diese letzteren. Th. Bowhill (1) gibt den Gipsblöcken die Gestalt jener schräg durchschnittenen Zylinder, welche für die in Reagensgläsern anzulegenden Kartoffelstrichzuchten üblich sind, und schließt sie auch in solche Gläser ein, was doch keine Verbesserung 30 ist. Der durch E. Wasserzug (1) empfohlene Ersatz der Gipsblöcke durch Filtrierpapier ebenso wie der 35 von Beijerinck (1) vorgeschlagene Agar bieten auch keine Vorteile. Die Anwendung des letzteren ist besonders umständ- 40 lich, indem das mehrmalige Auslaugen des Agars viel Zeit in Anspruch nimmt, und dazu kommt noch, daß die 45 Sporenbildung eine viel geringere ist als auf den Gipsblöcken.



Fig. 21. Weinhefe aus Walporzheim. Sproßverbände aus einer alten Haut; darunter auch Glieder, welche Sporen gebildet haben. — Vergr. 800. Nach Aderhold.

Die Bedingung betreffend feuchte Unter- 50 lage und Luftzutritt ist gleichfalls in Strichzuchten auf festen Nährböden gegeben. Und tatsächlich bilden sich auch unter diesen Umständen die Ascosporen. Schon

in den ersten Untersuchungen HANSEN's ist dies bemerkt worden, später auch durch andere Forscher. Die Rolle des Gipsblockes kann z. B. auch eine feuchte Brauereiwand für die dorthin verspritzte Hefe übernehmen, oder der feuchte Trubsack u. dgl. für die darauf angesiedelte Hefe aus 5 der Luft. Auch in den Hautbildungen kann man Sporen ab und zu antreffen, wie die *Fig. 21* an einem Beispiele zeigt. Doch sind dies nur Ausnahmen. Hingegen werden diese Organe selbstverständlich in den Hautbildungen derjenigen (verhältnismäßig wenigen) Saccharomyceten nicht fehlen, welche so gut wie ausschließlich nur als Haut und nicht 10 auch als Bodensatzhefe sich entwickeln, so z. B. besonders leicht und ohne weiteres Zutun bei dem *Sacch. membranaefaciens*. Man sieht also, daß jede Zelle, selbst solche, welche in der Mitte der mycelähnlichen Verzweigungen liegen, zugleich als Ascus auftreten kann. Dies gilt auch von denjenigen Arten, bei denen solche Bildungen sich finden, welche 15 in einem weit höherem Grade das Aussehen der bei den höheren Pilzen



Fig. 22. Saccharomycopsis capsularis SCHIÖNNING.
Sporenvegetation. *a* von einer Hefenwasserkultur, *b* von einer Hefenwasser-Gelatine-Agar-Kultur, *c* von einer Hefenwasserkultur. Hier hat eine Spore gekeimt und ist zu einem Mycelfaden ausgewachsen, in dessen äußerstem Glied sich Sporen gebildet haben. — Vergr. 500. Nach SCHIÖNNING.

auftretenden und als Mycel bezeichneten Entwicklungsstufe aufweisen. Solche Arten sind z. B. der *Sacch. Ludwigii* und der *Saccharomycopsis capsularis* (*Fig. 22*).

Das Eintreten von Sporenbildung innerhalb flüssiger Zuchten ist 20 auch schon öfter bemerkt worden, so durch HANSEN in wiederholt gelüfteten Zuchten in Hefenwasser bei mehreren Arten, und in 10-proz. Rohrzuckerlösung bei *Sacch. Ludwigii*, durch H. WILL (4) in einer Zucht in Würze seiner Bierunterhefe No. 93; durch P. ROESER (1) in 0,1-proz. Peptonlösung, durch HAUTEFEUILLE und PERREY (1) in einer Zucht einer 25 Weinhefe bei 28° C in Most.

Wünscht man die absolute Reinheit einer Sporenkultur zu bewahren, so kann man nach HANSEN die Aussaat in einer dünnen Wasserschicht am Boden eines Kölbchens unternehmen, oder in einer feuchten Kammer, z. B. in RANVIER's Kammer mit Luftzufuhr, oder man legt die Aussaat 30 auf feucht gehaltener Gelatine ohne Zusatz von Nährstoffen an. In

manchen Fällen wird man vielleicht auf den Gipsblöcken eine etwas reichlichere Sporenbildung als in der dünnen Wasserschicht oder auf der Gelatine erreichen können. Will man eine solche Gipsblockkultur gleichzeitig vor Infektion schützen, so kann man nach Schiönning (2) den Gipsblock in einem Hansen-Kolben anbringen (*Fig. 23*). Das sterile Wasser wird hier aus einem anderen Hansen-Kolben zugesetzt, indem die beiden Seitenrohre der Kolben in Verbindung gebracht werden. Die Hefe wird dagegen mittelst einer Pipette durch den Hals des Kolbens auf den Gipsblock gebracht. Kommt es darauf an, Zahlenwerte für die **Dauer der Entwicklung** der Sporen zu ermitteln, dann wählt man jenen Augenblick aus, zu welchem die ersten Anlagen zur Sporenbildung zu bemerken sind. Den Augenblick der Erlangung der Reife zu wählen, ist hingegen untunlich, weil man für die Erkennung dieser leider kein verläßliches Merkmal hat. Jenen Augenblick also für maßgebend haltend, hat zuerst Hansen (2) für sechs Arten von Saccharomyceten die Beziehung zwischen Temperatur und Dauer der Sporenbildung festgelegt. Später sind dann durch eine Reihe von Forschern solche Ermittlungen an einer (heute schon recht beträchtlichen) Anzahl von Arten angestellt worden, so z. B. durch H. Will (1, 4, 8), und durch J. Chr. Holm und S. V. Poulsen (2) an europäischen und durch A. Lasché (1) an amerikanischen Bierhefen, durch L. Marx (1), durch Ed. Kayser (2) und durch Ed. Kayser und G. Babba (1) an französischen, durch R. Aderhold (1) an deutschen, durch A. Nastukoff (1) an russischen und durch W. Seifert (1) an österreichischen Weinhefen, durch Ed. Kayser (1) an französischen Obstweinhefen, dann durch Chr. Grönlund (1), durch J. Chr. Nielsen (1), durch Alb. Klöcker (1) und durch H. Schiönning (3). Die Feststellungen der Minimal-, der Maximal- und der Optimaltemperatur für die Sporenbildung sind die wesentlichsten Bestimmungen bei solchen Ermittlungen. Eine Zusammenstellung einiger Reihen von derartigen Daten ist in der beiliegenden Tabelle enthalten. Den Zusammenhang zwischen der Höhe der Temperatur und der Zeitdauer für das Eintreten der Sporenbildung einer daraufhin geprüften Art kann man auch graphisch veranschaulichen, etwa so, daß man die verschiedenen Temperaturen, bei denen die Versuche angestellt wurden, als Abscissen und die zugehörigen Werte der Zeitdauer der Sporenbildung als Ordinaten eines rechtwinkeligen Koordinatensystemes absteckt und die derart erhaltenen Schnittpunkte durch eine Linie verbindet. Eine derartige Linie heißt in der Literatur meist kurzweg Sporenkurve. Unter „Entwicklungsgeschwindigkeit“ versteht R. O. Herzog (1) diejenigen Zahlenwerte, welche man bekommt, wenn man die Geschwindigkeit, mit welcher die Sporenbildung der betreffenden Art bei der tiefsten Temperatur erreicht wird, gleich 1 setzt. Er geht von den von Hansen angegebenen Temperaturkurven aus.



Fig. 23.
Gipsblock in einem Hansen-Kolben. Nach Schiönning.

Das Verhältnis zwischen der Entwicklungsgeschwindigkeit der Sporen und der betreffenden Temperatur hat Herzog graphisch dargestellt, indem er die Entwicklungsgeschwindigkeiten auf die Ordinaten-

achse, die Temperaturen auf die Abscisse auftrug; er gelangte dadurch zu Kurven, die mit den von TAMMANN für Fermente erhaltenen große Aehnlichkeit haben. Die von VAN'T HOFF bei chemischen Vorgängen beobachtete Regel, daß eine Temperaturerhöhung um 10° eine Ver-
5 doppelung bis Verdreifachung der Reaktionsgeschwindigkeit bewirkt, trifft auch für die Sporenbildung der Saccharomyceten zu.

HANSEN hat auf Grund seiner vorerwähnten Forschungsergebnisse betreffend den Entwicklungsgang der Sporenbildung eine Methode zur biologischen Analyse der Betriebshefe der Brauereien ausgearbeitet.
10 Diese ist dann insbesondere durch J. CHR. HOLM und S. V. POULSEN (1 u. 2) weiter entwickelt worden. HANSEN's Methode geht darauf aus, einen Gehalt an wilder Hefe (s. S. 8) in der Betriebshefe der Brauereien nachzuweisen, und zwar auf Grund der von ihm gemachten Beobachtung, daß die wilden Hefen bei der gleichen Temperatur schneller Sporen bilden
15 als die Kulturhefen. Nähere Angaben darüber werden im 7. Kapitel des V. Bandes gegeben werden. Auch im Bau der Ascosporen zeigen sich Unterschiede zwischen den untergärigen Brauereikulturhefen und den wilden Hefen. Die der letzteren zeigen gleichmäßigen und sehr stark glänzenden Inhalt und sind verhältnismäßig kleiner. Bei den
20 ersteren hingegen weist der Inhalt meist Vakuolen und Körnelung auf, und die Membran ist deutlich zu erkennen (HANSEN, WILL). Die Prüfung der obergärigen Brauereihefen und der Brennereihefen und Preßhefen nach diesem Verfahren ist zwar etwas heikler, weil diese beträchtlich früher und reichlicher als die untergärigen Bierhefen ihre Sporen bilden,
25 so z. B. eine von WILL untersuchte Art der Münchner Station schon nach 14 Stunden. Dennoch ist solche Prüfung, wie JÖRGENSEN (1) berichtet hat, ausführbar, wenn bei niedrigeren Temperaturen (12° C) gearbeitet wird. Noch geschwinder sind die Weinhefen. Von den 58 durch ihn geprüften Arten befand MARX deren 46, welche bei 25° C
30 weniger als 24 Stunden zur Sporenbildung brauchten. ADERHOLD und auch NASTUKOFF sind zu ähnlichem Ergebnis gelangt. Bisweilen geschieht es, daß eine Art, die man seit längerer Zeit im Laboratorium gezüchtet hat, die Fähigkeit zur Sporenbildung verliert, in den meisten Fällen jedoch nur für eine Zeit. Der erste, welcher Beobachtungen in
35 dieser Beziehung machte, war HANSEN (6). Er zeigte zugleich, daß man einer sonst sporenbildenden Art durch geeignete Behandlung die Fähigkeit zur Sporenbildung nehmen kann. Diese für die allgemeine Biologie so interessanten und wichtigen Versuche werden wir im 8. Kapitel näher besprechen. Wir machen hier nur darauf aufmerksam, daß man durch
40 Herstellung solcher sporenlosen Rassen der Kulturhefe die Sporenanalyse auf Gehalt an wilden Hefen in hohem Grade vereinfachen kann, indem man dann nicht Rücksicht auf die Temperatur und die Zeit zu nehmen braucht. Die Auffindung sporenbildender Zellen zwischen der asporogenen Kulturhefe ist dann ausreichend, um eine Einmischung fremder Hefe zu
45 konstatieren.

Der **Verlauf der Entwicklung** der Ascosporen soll nun beispielsweise an *Sacch. cerevisiae I* HANSEN verfolgt werden. Ungefähr 24 Stunden nach Anlegung der Striche auf dem Blocke und Einstellen der „Gipsblockkultur“ in den Thermostaten bei 25° C kratzen wir ein
50 wenig von einem Hefenstriche des Blockes mit Hilfe eines sauberen Glasstäbchens oder einer Nadel ab, verteilen in einem Tropfen Wasser, bedecken mit einem Deckglas und betrachten bei starker Vergrößerung (300—500). Wir werden so in einer mehr oder minder großen Anzahl

von Zellen deutliche Anfänge von Sporenbildung vorfinden; das Plasma hat sich zu mehreren Ballen gesondert, wie dies in *a—d* der *Fig. 24* veranschaulicht ist. Bald umgeben sich diese Kugeln mit je einer Membran, so daß nach abermals 24 Stunden schon reife Sporen (*f—j*) zu sehen sind. Das Verhalten des Zellkernes während dieser Zeit wird im 2. Kapitel näher betrachtet werden. Hinzuzufügen ist noch, daß ein Teil des Plasmas der Mutterzelle (Ascus) übrig bleibt und die Sporen miteinander etwas zusammenhält.

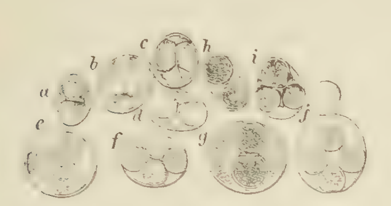


Fig. 24. Saccharomyces cerevisiae I Hansen.
Ascosporenbildung. — Vergr. 1000. Nach Hansen.

Eine sorgfältige Durchsuchung der Präparate wird uns bald zu der Beobachtung führen, daß in betreff der Größe der Sporen beträchtliche Unterschiede herrschen, und zwar nicht bloß zwischen solchen in verschiedenen Zellen, sondern sogar zwischen solchen eines und desselben Ascus. Auch die Zahl (2—9) der in den einzelnen Asci entstandenen Sporen werden wir ungleich befinden. Was wir schon für die Zellen der Bodensatzhefe bemerkt haben, gilt auch für die Ascosporen: weder die Gestalt noch die Größe ist ein verläßliches Artmerkmal und kann also für sich allein nicht für die Unterscheidung der einzelnen Arten bestimmend sein. Nur in einigen besonderen Fällen ist dies möglich, und zwar dann, wenn eine Art z. B. aus der Gruppe des *Sacch. anomalus* vorliegt. Der erste Vertreter aus dieser Gruppe ist durch Hansen (1) untersucht und mit der eben angeführten Artbezeichnung belegt worden. Zum Unterschiede von allen übrigen bis dahin bekannt gewesenen Saccharomyceten haben bei dieser neuen Art die Ascosporen nicht die Gestalt einer vollkommenen Kugel, sondern es fehlt zu dieser eine mehr oder minder große Calotte. Rings um den Umkreis der dieser letzteren entsprechenden (ebenen oder schwach gewölbten) Begrenzungsfläche ist dann noch eine vorspringende Leiste vorhanden, so daß die Ascosporen die Gestalt eines Hutes aufweisen. Die *Fig. 25* gibt davon ein Bild. Im Laufe der Jahre sind dann noch andere Arten mit zwar gleichen Ascosporen wie hier, aber verschiedenem Verhalten in anderer Hinsicht entdeckt worden, so daß man heute schon mit einer ganzen Gruppe von solchen Saccharomyceten es zu tun hat. Zu dieser Gruppe gehört auch *Sacch. Saturnus* Klöcker, dessen Sporen citronenförmig und mit einer Leiste um die Mitte von der einen Spitze zur anderen versehen sind. Die Mitte der Spore selbst besteht aus einer stärker lichtbrechenden Kugel, deren Inhalt wahrscheinlich fettartiger Natur ist. Aus der *Fig. 26* ist die Gestalt der Sporen dieser Art ersichtlich.

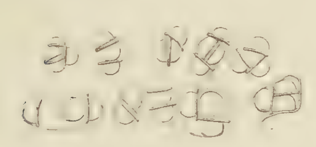


Fig. 25. Saccharomyces anomalus Hansen.
Ascosporen. In drei Fällen sind sie schon ganz frei. In einem Falle ist die Membran der Mutterzelle eben aufgesprungen, in den übrigen noch ganz. — Vergr. 1000. Nach Hansen.

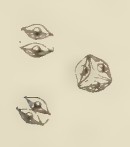


Fig. 26. Saccharomyces Saturnus Klöcker.
Zellen mit Sporen von einer Haut auf Maltose-Hefenwasser. — Vergr. 1000. Nach Klöcker.

Sporen mit einer stark lichtbrechenden Mittelpartie finden sich übrigens bei mehreren verschiedenen Arten und haben den Namen „Perlsporen" bekommen. Solche kommen u. a. bei *Sacch. hyalosporus* Lindner vor. Die Sporen des *Sacch. Marxianus* Hansen besitzen gewöhnlich 5 Nierenform.

Ganz einzigstehend ist die Gestalt der Sporen bei den zwei seltenen Gattungen *Monospora* und *Nematospora*, nämlich sehr lang und schmal, drahtförmig oder spindelförmig; bei denen der letztgenannten Gattung, die von Peglion (1) in kranken Haselnüssen gefunden wurde, endet das eine 10 Ende der Spore sogar mit einer Geißel. Die erstere Gattung ist von Metschnikoff (1) als Parasit in den Eingeweiden der Flohkrebse (*Daphnia*) aufgefunden worden. In den allermeisten Fällen hat die Spore nur eine Membran. Eine Ausnahme bildet die Gattung *Saccharomycopsis*, in welcher die Spore zwei Membranen besitzt. Wir werden 15 später gelegentlich der Betrachtung der Keimung der Sporen dieses Verhalten näher besprechen.

In der Familie der *Saccharomycetes* geht die vegetative Zelle einfach in eine Sporenmutterzelle, einen Ascus, über. Bei einigen Arten ist dies bei mehr als 90 Proz. der Zellen der Fall, bei anderen Arten dagegen 20 nur bei ganz wenigen Zellen.

Den Untersuchungen Hansen's (8) über das Verhalten zwischen der Sprossung und der Sporenbildung entnehmen wir das folgende: Es findet ein Kampf zwischen Sprossung und Sporenbildung statt. Die Zellen versuchen, Sprosse zu bilden, solange die Verhältnisse es erlauben. In 25 den Gärbottichen der Brauereien z. B. vermehren sich die Zellen seit alters her nur durch Sprossung; es wird ihnen keine Gelegenheit zur Sporenbildung gegeben. Säen wir junge, kräftige Zellen z. B. auf einem feuchten Gipsblock aus, so werden sie durch einige Generationen hindurch sich durch Sprossung vermehren, ehe die Sporenbildung eintritt. 30 Dies ist in Uebereinstimmung mit dem, was gewöhnlich im ganzen Pflanzenreiche vor sich geht: bevor die Fruchtbildung stattfindet, wird eine Reihe vegetativer Glieder gebildet. Hansen (8) hat nun aber dargetan, daß die Saccharomyceten die vegetativen Glieder ganz überspringen können. Er machte den Versuch in der Weise, daß er die *Weinhefe* 35 *Johannisberg II* in einer gesättigten Lösung von Gips in Wasser züchtete; eine solche Lösung besitzt die Eigenschaft, die Sprossung zu verhindern. Gleichzeitig trug er dafür Sorge, daß die Bedingungen für die Sporenbildung zugegen waren. Dadurch brachte er die vegetative Zelle zur Sporenbildung ohne vorherige Sprossung, und was noch merkwürdiger 40 ist, er brachte auch die Spore direkt zur Bildung von neuen Sporen in ihrem Innern. Die Spore wurde also in eine Sporenmutterzelle umgewandelt, ein Verhalten, das bisher einzig unter den Ascomyceten dasteht.

Der Gang in diesem Experimente war der folgende: Wenn eine 45 große Anzahl Zellen der genannten Art (bei welcher der allergrößte Teil der Zellen, bis 99 Proz., Sporen bildet) in ihrem Innern Sporen entwickelt hatten, wurden sie in eine dünne Schicht Würze in einem Freudenreich-Kolben eingetragen und bei einer günstigen Temperatur hingestellt. Nach Verlauf von 4 Stunden waren die Sporen gewöhnlich 50 aufgeschwollen und hatten oft barocke Gestalten angenommen, wie auch Zusammenschmelzungen häufig waren. Nach weiteren 3—5 Stunden war die Wand der Mutterzelle zersprengt. Nun wurden die Sporen aus der Nährflüssigkeit entfernt und in andere Kolben übertragen, in welchen

sich eine dünne Schicht einer gesättigten. wässerigen Lösung von Gips befand, und bei 25° C hingestellt. Nach 3—6 Tagen hatten bei dieser Temperatur die meisten der geschwollenen Sporen (nicht nur die einzeln liegenden, sondern auch die zusammengewachsenen) in ihrem Innern Sporen entwickelt. Das Obenstehende wird durch die *Fig. 27* und *Fig. 28* deutlich illustriert. Später hat GUILLIERMOND (2) dasselbe Verhalten bei *Sacch. Ludwigii* beobachtet.

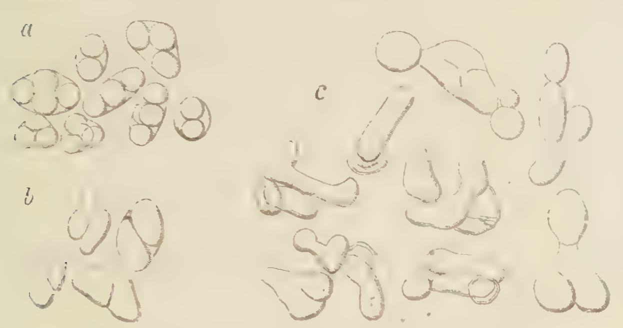


Fig. 27. Weinhefe Johannisberg II.
a eine Gruppe von Zellen mit reifen Sporen, *b* dieselbe nach Züchtung 4 Stunden in einer dünnen Schichte von Würze bei 34° C, *c* nach 7—9 Stunden bei 34° C. Besonders in der letzten Gruppe sieht man Beispiele von Verschmelzungen der Sporen; die zersprengte Wand der Mutterzelle liegt bei mehreren der Sporen. Einige der Zellen rechts haben Sprosse zu treiben angefangen. — Vergr. 1000. Nach HANSEN.

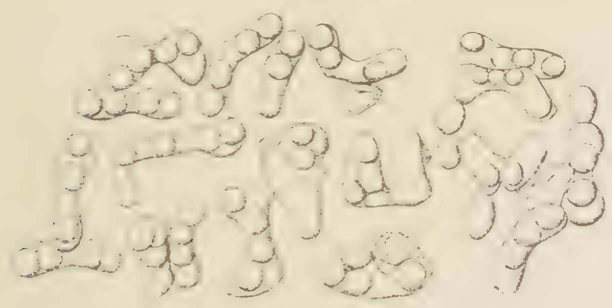


Fig. 28. Weinhefe Johannisberg II.
Die aufgeschwollenen Sporen von *Fig. 27,c* haben nach 3—6-tägigem Aufenthalt in einer gesättigten Lösung von Gips bei 25° C Sporen in ihrem Innern gebildet; in den meisten der Zellen reife Sporen, hingegen unreife nur in wenigen. An einigen Stellen liegt die zersprengte Wand der Mutterzelle neben der Spore. — Vergr. 1000. Nach HANSEN.

Der erste, welcher die Beobachtung machte, daß der Ascus durch **Verschmelzen zweier Zellen** gebildet werden kann, war SCHIÖNNING (1) und zwar bei *Schizosaccharomyces octosporus*. Aus der nebenstehenden *Fig. 29* ist der Entwicklungsgang ersichtlich. In einer vegetativen Zelle bildet sich eine Scheidewand, durch welche sich die Zelle in zwei teilt. Diese zwei neugebildeten Zellen schmelzen wieder zusammen, und jetzt entwickeln sich in dieser (aus zweien gebildeten Zelle) acht Sporen. Später hat GUILLIERMOND (1) gezeigt, daß bei dieser Art auch das Verschmelzen solcher zwei Zellen nicht durch Lösung der Scheidewand stattfindet, sondern daß die Zellen Ausstülpungen treiben, welche dann zusammenwachsen können.

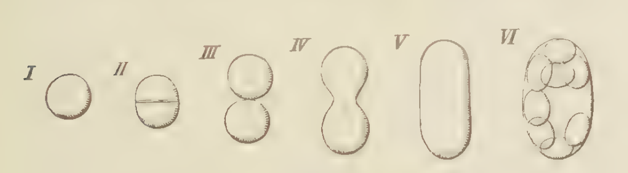


Fig. 29. *Schizosaccharomyces octosporus* BEIJERINCK.
Die Entstehung des Ascus. *I* eine runde Zelle kurz vor der Bildung der Querwand. *II* nach einer Stunde, *III* nach 3, *IV* nach 6, *V* nach 10 und *VI* nach 17 Stunden. Die Zeitangaben sind vom Anfang der Beobachtung an gerechnet. Vergr. 1000. — Nach SCHIÖNNING.

Das gleiche Verhalten beobachtete er auch, wenn zwei Zellen, welche nicht durch Teilung einer einzelnen Zelle gebildet waren, verschmelzen und danach zum Ascus werden. Und endlich machte er auch die Beobachtung, daß die Ascusbildung, obwohl seltener, in derselben Weise vor 5 sich gehen kann wie bei den gewöhnlichen *Saccharomyces*-Arten, d. h. also ohne irgend ein Verschmelzen überhaupt. Bei *Schizosacch. Pombe* und *Schizosacch. mellacei* fand er ebenfalls, daß zwei Zellen verschmelzen können und dadurch zum Ascus werden. Hierdurch werden u. a. die merkwürdigen hantelförmigen Zellen gebildet, denen man so häufig in 10 Sporenkulturen dieser Arten begegnet.

Bei einem sproßbildenden, saccharomycesähnlichen Pilze beobachtete Barker (1) ein Verschmelzen der Zellen vor der Sporenbildung. Zwei nahe aneinander liegende Zellen treiben Ausstülpungen gegeneinander

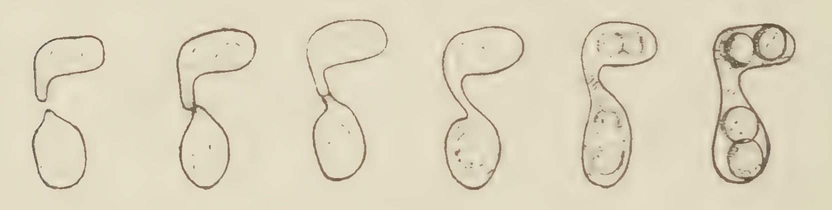


Fig. 30. Zygosaccharomyces Barkeri Saccardo et Sydow. Ascusbildung durch Verschmelzung zweier Zellen in einem hängenden Tropfen destillierten Wassers bei 25° C. — Vergr. 1000. Nach Barker.

vor; diese wachsen der Länge nach, bis sie einander begegnen, und die 15 Wand an der Berührungsstelle zerbricht (*Fig. 30*). Es ist in dieser Weise aus zwei Zellen eine entstanden, welche oft hantelförmige Gestalt annimmt. Wegen dieses Verhaltens stellte Barker für diese Art eine neue Gattung *Zygosaccharomyces* auf. Saccardo und Sydow haben die Art selbst dann *Zygosacch. Barkeri* genannt.

20 Man hat das im Vorhergehenden betrachtete Verschmelzen der Zellen, welches in einigen Fällen bei den letztgenannten zwei Gattungen der Ascusbildung vorausgeht, als einen Geschlechtsakt, eine Kopulation, auffassen wollen. Die Vorkämpfer dieser Anschauung sind namentlich Barker und Guilliermond. Inwieweit diese Auffassung die richtige 25 ist, bleibt noch zu entscheiden. Es wird in erster Linie darauf ankommen, was man unter einem Geschlechtsakt versteht. In betreff der Untersuchungen über den feineren Bau des Zellkerns und der Zelle, welche gerade für diese Fragen von Wichtigkeit sind, verweisen wir auf das 2. Kapitel des vorliegenden Bandes.

30

§ 6. Die Keimung der Ascosporen.

Die erste Beobachtung der Keimung der Ascosporen der Saccharomyceten ist wohl durch Reess (2) geschehen. Genaue und umfassende Untersuchungen über diesen Vorgang und zwar bei reingezüchteten Arten sind dann durch E. Chr. Hansen (7) angestellt worden. Wesentlich auf 35 dessen Feststellungen stützen sich die nachstehenden Angaben.

Wir können im allgemeinen **zwei Arten des Verlaufes** der Sporenkeimung unterscheiden, die eine durch Sprossung, die andere durch

Keimschlauchbildung. Für die **erste** und weitaus häufigste ist der *Sacch. cerevisiae I* Hansen ein Beispiel. Dessen Ascosporen können sofort nach erlangter Reife auskeimen, sofern die äußeren Bedingungen nicht hinderlich sind. Anwesenheit von Wasser ist dazu unerläßlich. Von diesem, und auch von etwa vorhandenen Nährstoffen, nehmen die zur Auskeimung sich anschickenden Sporen reichliche Mengen auf und schwellen dadurch zu beträchtlicher Größe an. Falls sie noch von der Mutterzellmembran umschlossen sind, wird diese ausgedehnt und nimmt einen etwas eckigen Umriß an, wie die *Fig. 31* in *a* und *d* zeigt. Die in der Mutterzelle noch vorhandenen Plasmareste werden so zwischen den Sporen zu Platten zusammengepreßt, wirken aber ihrerseits wieder auf die drückenden Sporen zurück und zwingen diese, solange die Mutterzellmembran noch standhält, sich etwas polyedrisch zu gestalten. Der Ascus sieht infolgedessen wie g e k a m m e r t aus. In manchen Fällen kommt es sogar zu einer Verwachsung (Verschmelzung) der Sporenmembranen an den Berührungsstellen. In *g* ist ein solcher Fall veranschaulicht. In der Mutterzelle lagen drei Sporen. Diese waren durch Verwachsung ihrer Membranen zu einem Ganzen vereint worden. Dieses wurde durch Drücken auf das Deckglas des Präparates aus der Mutterzelle hinausgequetscht, wobei zugleich die Membranen der drei verbundenen Sporen an je einer Stelle aufplatzten. In *e* ist ein ähnlicher Fall abgebildet, nur mit dem Unterschiede, daß hier in der Mutterzelle vier Sporen vorhanden waren, von denen eine nach dem Aufquetschen der Mutterzellmembran, welche sich auf ihren anfänglichen Umfang wieder zusammengezogen hat, umschlossen blieb. Auch ohne künstlichen Eingriff muß die Mutterzellmembran schließlich der wachsenden Spannung erliegen und die Sporen freigeben, welche dann eine Knospe treiben (*f*) und sich fernerhin ähnlich verhalten wie eine vegetative Zelle. Für die Reichlichkeit der weiteren Sproßentwicklung sind selbstverständlich die äußeren Bedingungen (Nährboden, Luftzutritt, Temperatur) bestimmend.

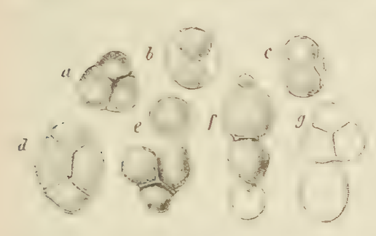


Fig. 31. Saccharomyces cerevisiae I Hansen.
Sporenkeimung. Erklärung im Text.
Vergr. 1000. Nach Hansen.



Fig. 32. Saccharomyces cerevisiae I Hansen.

a Drei miteinander zusammenhängende, aus der Mutterzelle ausgetretene Sporen. *a'* dieselben bei 20° C in Würze in der Ranvier'schen Kammer nach 19 Stunden. Zwei der Sporen mit je einer Knospe. *a''* nach 22 Stunden; *a'''* nach 30 Stunden.

b Eine Mutterzelle mit vier Sporen; die beiden unteren durch die zwei oberen zum Teil verdeckt. *b'* nach 18 Stunden (wie bei *a'*). Die Membran der Mutterzelle ist gerissen und hängt, ähnlich einem Schleier, auf der aus den Sporen herangewachsenen Zellkolonie. — Vergr. 1000. Nach Hansen.

Die *Fig. 32* gibt dafür zwei Beispiele. In manchen Fällen wird die durch Verschmelzung der Membranen entstandene gemeinsame Trennungswand, durch welche zwei Sporen miteinander zusammenhängen, aufgelöst, worauf die Inhalte beider Sporen miteinander verschmelzen. Nach diesem

ersten Typus verläuft die Keimung der Ascosporen wohl aller in der Brauerei, Brennerei und Weinbereitung verwendeten Hefen. Ganz in derselben Weise keimen auch die Sporen der dem *Sacch. anomalus* sich anreihenden Arten. Die *Fig. 33* veranschaulicht dies an drei Beispielen. Sie betreffen Aussaaten von Sporen, welche aus alten Gipsblockkulturen entnommen und in Bierwürze in der Ranvier'schen Kammer gehalten wurden, und zwar die oberste Reihe bei 28° C und die beiden anderen bei 23° C. Die keimende Spore schwillt an und treibt nach und nach an mehreren Stellen ihrer Oberfläche eine Anzahl von Knospen hervor, welche dann ihrerseits ebenfalls auf dem Wege der Sprossung sich vermehren. Die hutkrempenähnliche Leiste der Spore blieb dabei im ersten (*a*) und dritten (*c*) Beispiele erhalten, im zweiten hingegen ging sie verloren.

Fig. 33. *Saccharomyces anomalus* Hansen. Sporenkeimung. *a* Eine Spore zu Beginn der Keimung, mit der Leiste nach links gerichtet. a' nach 7 Stunden; eine Knospe ist hervorgetrieben worden. a'' nach 12 Stunden; eine zweite Knospe ist an der Spore aufgetreten. a''' nach 15 Stunden. a'''' nach 20 Stunden. — *b* Eine Spore mit der Leiste nach rechts gerichtet. b' nach 10 Stunden. b'' nach 21 Stunden. b''' nach 24 Stunden. b'''' nach 25 Stunden. b''''' nach 27 Stunden; die Spore hat sich samt ihren Tochterzellen in der Nährlösung um 180° gedreht. — *c* Eine Spore mit der Leiste nach unten gerichtet. c' nach 8 Stunden. c'' nach 10 Stunden. c''' nach 24 Stunden. — Vergr. 1000. Nach Hansen.

Für die **zweite** Art des Verlaufes der Sporenkeimung liefert der *Sacch. Ludwigii* ein Beispiel. Hier treibt die Spore nicht, wie bei dem ersten Typus, einen ihr an Gestalt ähnlichen rundlichen Sproß sondern ein wurstförmiges Gebilde, einen Keimschlauch, hervor, wie die *Fig. 34* in g''' h''' sehr deutlich erkennen läßt. Dieser Keimschlauch gehört zu denjenigen Bildungen, welche man in der Mykologie als **Promycel** bezeichnet. Er erst ist es, welcher die Sproßzellen dann hervorbringt und also zwischen diesen und der Spore als Zwischenglied eingeschaltet ist. Die an ihm entstehenden Hefenzellen von normaler Gestalt werden zudem nicht, wie dies sonst Regel ist, durch Abschnürung frei, sondern durch Einfügung einer Querwand an jener Stelle, an welcher schließlich die Ablösung eintritt. In d''''' und g'''' ist dies dargestellt. Sehr oft aber ist das Promycel nicht das Ergebnis des Auskeimens einer einzigen Spore, sondern des Zusammentretens zweier Keimschläuche zu einer neuen Zelle. Solcher Verlauf, welcher also eine wahre Zellverschmelzung in sich schließt, ist in d—d'''''' dargestellt. Man sieht darin, wie die beiden Sporen einseitig zu je einem gestreckten Gebilde (d') auskeimen, worauf dann schon Verschmelzung (d'') der zwei Keimschläuche zu einer einzigen Zelle eintritt, welche fernerhin einseitig zum Promycele (d'''') auswächst. Dieses gliedert dann (d''''') eine Tochterzelle ab, welche bald die für diesen Pilz recht bezeichnende Citronen- oder Keulengestalt (d'''''') annimmt. Die hier beschriebene Zellverschmelzung ist von der oben beim ersten Typus angeführten in zweierlei Hinsicht verschieden: dort war sie Ausnahme, hier ist sie fast Regel; dort trat sie an den Sporen selbst ein, hier hingegen erst an den aus diesen hervorgegangenen Neubildungen (Keimschläuchen). Die Verschmelzung

tritt nicht in allen Fällen ein. GUILLIERMOND (1 u. 2) hat neulich eine Varietät von *Sacch. Ludwigii* gefunden, bei welcher sie niemals stattfand. Bei einer anderen Varietät sah er bisweilen Sporen fusionieren, die von verschiedenen Asci herstammten. Die Verschmelzung wird ab und zu durch die Verschiedenheit der Richtungen verhindert, nach welchen hin 5

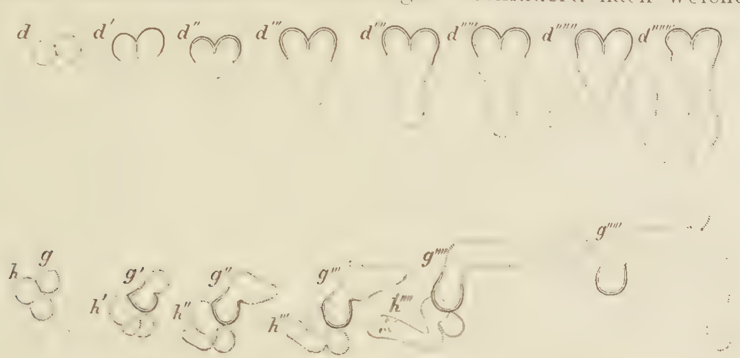


Fig. 34. Saccharomyces Ludwigii HANSEN.
d Zwei Sporen, welche einseitig auskeimen (*d'*), fusionieren (*d''*), zu einem Promycel (*d'''*) auswachsen, an dessen Scheitel eine Knospe (*d''''*) hervortreiben und durch Einschaltung einer Querwand (*d'''''*) abtrennen, worauf jene (*d''''''*) sich abrundet, welcher Vorgang mehrmals (*d'''''''*) sich wiederholt.
g, h Zwei Sporen, deren jede zu einem Keimschlauche auswächst, welcher in der Folge nicht mit dem anderen verschmilzt, sondern für sich allein Tochterzellen abgliedert. Vergr. 1000. Nach HANSEN.

die beiden Keimschläuche schon von Anfang (*g'''*) an sich entwickeln, oder durch frühzeitige Verkümmerung des einen von ihnen, oder es kommt überhaupt nur zur Bildung eines einzigen, weil die übrigen anliegenden Zellen, z. B. infolge von Alter, unfähig sind, auszukeimen. Außer an dem *Sacch. Ludwigii* HANSEN ist die eben beschriebene zweite 10 Art des Verlaufes der Sporenkeimung, bzw. das Verschmelzen der Keimschläuche, bisher nur noch an einem einzigen Saccharomyceten beobachtet worden, welchen J. BEHRENS (1) auf frischen Hopfendolden vorgefunden hatte.

In der Gattung *Saccharomycopsis*, deren Spore, wie man sich aus 15 dem Vorhergehenden erinnern wird, im Gegensatze zu denen der übrigen Saccharomyceten, mit zwei Membranen ausgestattet ist, geht die Keimung nach dem ersten Typus, also durch Sprossung, vor sich. Während der Keimung zerreißt die 20 äußere Membran; dies geschieht aber bei den zwei zu dieser Gattung gehörigen Arten in verschiedener Weise. Die eine Art, *Saccharomycopsis guttulatus* ist ein niemals fehlender Bewohner des Magen- 25 und Darminhaltes und also auch des Kotes des ausgewachsenen Kaninchens und war daselbst durch R. REMACK im Jahre 1845 zuerst bemerkt, durch ROBIN (1) dann im Jahre 1847 unter dem Namen *Cryptococcus* 30 *guttulatus* den Hefen zugeteilt und von späteren Forschern für einen *Saccharomyces* erklärt worden. Wegen des Baues der



Fig. 35. Saccharomycopsis guttulatus ROBIN.
Von der noch ganzen Ascusmembran umschlossen, zwei Ascosporen. Die äußere Sporenmembran wurde bei der einen Spore am Pol aufgerissen, bei der anderen seitlich. — Vergr. 1066. Nach WILHELMI.

Spore stellte SCHIÖNNING (3) im Jahre 1903 diese Art mit dem von ihm in Erde aus den Alpen aufgefundenen *Saccharomycopsis capsularis*, bei welchem der Bau der Spore mit demjenigen bei *Saccharomycopsis guttulatus* übereinstimmt, zusammen. Die Keimung der Ascosporen der letztgenannten Art ist von A. WILHELMI (1) beschrieben worden. Die äußere Membran zerreißt entweder an einem Pole oder an der Seite, wie es aus der *Fig. 35* ersichtlich ist. Bei *Saccharomycopsis capsularis* dagegen fand SCHIÖNNING, daß die äußere Membran nach einer bestimmten Linie aufreißt, welche oft schon zu sehen ist, bevor die Spore zur Keimung gebracht worden ist. Die äußere Membran teilt sich in zwei Klappen, was aus der beistehenden *Fig. 36* ersichtlich ist. Bei den beiden Arten geht die Keimung selbst durch Sprossung vor sich.



Fig. 36. Saccharomycopsis capsularis SCHIÖNNING.
Keimende Spore in RANVIER's Kammer mit Würze bei gewöhnlicher Zimmertemperatur. *a'* um 2 Uhr, *a''* um 4 Uhr, *a'''* um 6 Uhr und *a''''* um 11 Uhr. — Vergr. 1000. Nach SCHIÖNNING.

Bei den beiden Gattungen *Monospora* und *Nematospora* geschieht die Keimung ebenfalls durch gewöhnliche Sprossung. Bei der ersteren entwickelt sich die Sprosse an der Seite der langen, schmalen Spore, bei der letzteren verliert die spindelförmige Spore ihre Geißel, die Länge nimmt ab, und die Sprosse werden von den Spitzen abgeschnürt.

Literatur

zum Kapitel Allgemeine Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Saccharomyceten und Schizosaccharomyceten.

*Aderhold, R., (1) Landw. Jahrbücher, 1894, Bd. 23, S. 587. *Barker, B. T. F., (1) Philos. Transact. Roy. Society, London, 1901, Bd. 194, S. 467. — (2) J. federated Inst. Brewing, 1902, Bd. 8, S. 26. *de Bary, A., (1) Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze etc., Leipzig 1884, S. 289. *Behrens, J., (1) W. f. Brauerei, 1896, Bd. 13, S. 802. *Beijerinck, M. W., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 657. *Bowhill, Th., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1899, Bd. 5, S. 287. *Cagniard-Latour, Ch., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1837, Bd. 4, S. 905; Ann. de chim. et de phys., 1838, Bd. 68, S. 206. *Elion, H., (1) Centralbl. f. Bakt., 1893, Bd. 13, S. 749. *Engel, (1) Les ferments alcooliques. Thèse. Paris 1872. *Grönlund, Chr., (1) Vidensk. Medd. fra d. Naturh. For., 1892; Z. f. d. ges. Brauwesen, 1892, Bd. 17, S. 289. *Guilliermond, A., (1) Recherches cytologiques s. l. levures. Lyon 1902; Comptes rend. de l'Ac., 1901, Bd. 132, S. 175 u. 1194; Bd. 133, S. 242. — (2) Bulletin Soc. Mycologique de France, 1903, Bd. 19, S. 18. *Hansen, E. Chr., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1879, Bd. 1, S. 49. — (2) Ebenda, 1882, Bd. 1, S. 197; 1883, Bd. 2, S. 13. — (3) Ebenda, 1886, Bd. 2, S. 92. — (4) Allgem. Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzfabr., 1887, Bd. 16, S. 518; Centralbl. f. Bakt., 1887, Bd. 2, S. 118. — (5) Comptes rendus de Carlsberg, 1888, Bd. 2, S. 168; 1900, Bd. 5, S. 1. — (6) Centralbl. f. Bakt., 1889, Bd. 5, S. 632. — (7) Comptes rendus de Carlsberg, 1891, Bd. 3, S. 44. — (8) Ebenda, 1886, Bd. 2, S. 92; 1902, Bd. 5, S. 64. — (9) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 12, S. 529. *Hautefeuille, P., und Perrey, A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1894, Bd. 118, S. 589. *van Hest, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1903, Bd. 26, S. 757. *Herzog, R. O., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1903, Bd. 37, S. 396. *Holm, J. Chr., und Poulsen, S. V., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1886, Bd. 2, S. 88. — (2) Ebenda, 1888, Bd. 2, S. 137. *Jörgensen, A., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1891, Bd. 14, S. 45. *Kayser, Ed., (1) Ann. Pasteur, 1890, Bd. 4, S. 321. — (2) Ebenda, 1892, Bd. 6, S. 569. — (3) La Bière, 1895. *Kayser, Ed., und Barba, G., (1) Bulletin du Ministère de l'Agriculture, Paris 1896; Kochs Jahresb., 1896, Bd. 7, S. 126. *Klöcker, A., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1895, Bd. 4, S. 20. *Koch, R., (1) Mitt. Kais. Ges.-Amt, 1881, Bd. 1, S. 252. *Kützing, Fr., (1) J. f. prakt. Chem., 1837, Bd. 11, S. 385. *Lasché, A., (1) Der Braumeister,



Bilder der Kolonien einiger Hefenarten auf festen Nährböden.

Fig. 1. Hefe Saaz,
auf 6-proz. Hefenwasser-Gelatine mit 10 Proz. Saccharose.

Fig. 3. Hefe Saaz,
auf 12-proz. Hefenwasser-Gelatine mit 10 Proz. Saccharose.

Fig. 5. Hefe Saaz,
Sommer-Kolonie auf Würze-Gelatine.

Fig. 2. Hefe Frohberg,
auf 6-proz. Hefenwasser-Gelatine mit 10 Proz. Saccharose.

Fig. 4. Hefe Frohberg,
auf 12-proz. Hefenwasser-Gelatine mit 10 Proz. Saccharose.

Fig. 6. Hefe Saaz,
Winter-Kolonie auf Würze-Gelatine.

Fig. 7. Sacch. Pastor. I HANSEN,
auf Würze-Gelatine.

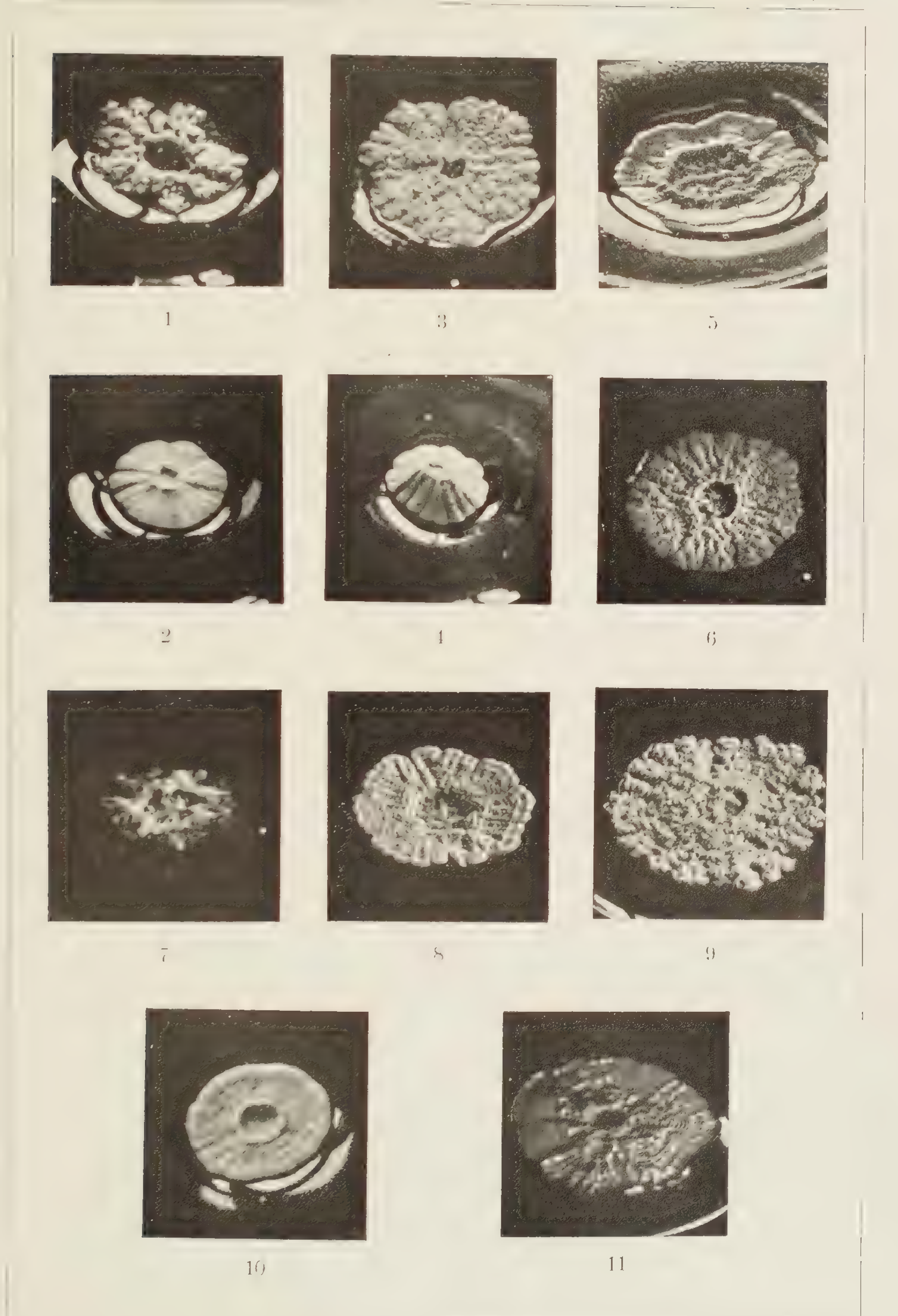
Fig. 8. Sacch. Pastor. II HANSEN,
auf Würze-Gelatine.

Fig. 9. Sacch. Pastor. III HANSEN.
auf Würze-Gelatine.

Fig. 10. Sacch. ellips. I HANSEN,
auf Würze-Gelatine.

Fig. 11. Sacch. ellips. II HANSEN,
auf Würze-Gelatine.

Alle Figuren in natürlicher Größe nach P. LINDNER.
Die weißen Ringstücke, welche in einigen Figuren das Bild der Kolonie umgeben, sind Reflexlichter der glatten Oberfläche des Nährbodens.



Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**



Chicago, 1891, S. 180. ***Lepeschkin,** W. W., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1903, Bd. 10, S. 145. ***Lindner,** P., (1) W. f. Brauerei, 1893, Bd. 10, S. 692. ***Marx,** L., (1) Moniteur scientifique, 1888, Nr. 563. ***Metschnikoff,** E., (1) Virchows Archiv, 1884, Bd. 96. ***Mitscherlich,** E., (1) Ber. ü. d. zur Bekanntmachung geeigneten Verhandl. d. Kgl. preuß. Akad. d. Wiss. zu Berlin, Februar 1843. ***Müller-Thurgau,** H., (1) Bericht ü. d. Verh. d. XII. Deutschen Weinbau-Kongresses in Mainz, 1891. ***Nastukoff,** A., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 420. ***Nielsen,** J. Chr., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1894, Bd. 3, S. 176. ***Pasteur,** L., (1) Bulletin Soc. chimique de Paris, 1862, S. 62. — (2) Études sur le vin, etc., Paris 1866. — (3) Études sur la bière, etc., Paris 1876. ***Peglion,** V., (1) Rendic. della R. Acc. dei Lincei, 1897; Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1901, Bd. 7, S. 754. ***Rayman,** B., und **Kruis,** K., (1) Mitt. d. Versuchsstat. f. Spiritusind. zu Prag, 1891, Bd. 1. ***Reess,** M., (1) Bot. Ztg., 1869, Bd. 27, S. 105. — (2) Bot. Unters. ü. d. Alkoholgärungspilze, Leipzig 1870. ***Robin,** (1) Des végétaux qui croissent s. l. animaux vivants, Paris 1847. ***Roeser,** P., (1) Ann. Pasteur, 1893, Bd. 7, S. 41. ***Schiönning,** H., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1895, Bd. 4, S. 30. — (2) Ebenda, 1896, Bd. 4, S. 89. — (3) Ebenda, 1903, Bd. 6, S. 103. ***Schroeter,** J., (1) Beitr. z. Biol. d. Pflanz., 1872, Bd. 1, H. 2, S. 109. ***Schwann,** Th., (1) Poggendorffs Ann., 1837, Bd. 41, S. 184. — (2) Mikroskop. Unters. ü. d. Uebereinstimmung in d. Struktur u. d. Wachstum d. Tiere u. Pflanzen, Berlin 1839. ***Seifert,** W., (1) Weinlaube, 1901, Bd. 33, S. 2. ***Seynes,** J., de, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1868, Bd. 57, S. 105. ***Wasserzug,** E., (1) Bulletin Soc. bot. de France, 1888, Bd. 35. ***Wichmann,** H., (1) Centralbl. f. Bakt., 1893, Bd. 14, S. 62. ***Wilhelmi,** A., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 305. ***Will,** H., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1891, Bd. 14, S. 145. — (2) Ebenda, 1894, Bd. 17, S. 187; 1897, Bd. 20, S. 77. — (3) Ebenda, 1894, Bd. 17, S. 315. — (4) Ebenda, 1895, Bd. 18, S. 1. — (5) Ebenda, 1898, Bd. 21, S. 443; 1899, Bd. 22, S. 151. — (6) Ebenda, 1899, Bd. 22, S. 151. — (7) Ebenda, 1902, Bd. 25, S. 241; 1904, Bd. 27, S. 176. — (8) Ebenda, 1887, Bd. 10, S. 357.

(*Manuskript-Einlauf: 19. Jan. 1905*)

2. Kapitel.

Anatomie der Hefenzelle.

Von Prof. Dr. H. Will,

Vorstand der physiolog. Abteilung der Wissenschaftl. Station für Brauerei in München.

§ 7. Entwicklung der Zellhaut. Dicke. Schichtung.

Im Vergleich zu der ungemein großen Zahl von „Sproßpilzen“ der verschiedensten Gruppen, sowohl der echten, sporenbildenden Hefen (Saccharomyceten), wie der nicht sporenbildenden Sproßpilze der Gruppen *Mycoderma, Torula* und anderer mit den verschiedenartigsten Erscheinungen an der Zellhaut, ist das bis jetzt vorliegende Tatsachenmaterial zur Kenntnis der letzteren noch recht dürftig. Jedenfalls müssen die interessanten, dicken, knorpelartigen Hautbildungen gewisser typischer *Torula*-Arten, die oft ungemein starke Verschleimung der Zellhaut mancher zu der gleichen und verwandten Gruppen gehörigen Arten ebenso wie die Zellhaut der an der Oberfläche schwimmenden und hier offenbar durch bestimmte chemische und physikalische Eigenschaften der Haut gehaltenen Zellen der *Mycoderma-* und *Torula*-Arten und diesen nahe stehender Gruppen von Sproßpilzen noch gründlicher und von allgemeinen Gesichtspunkten untersucht werden.

Die eingehendsten Untersuchungen sind bis jetzt an der Zellhaut von Saccharomyceten und zwar in erster Linie von Bierhefen ausgeführt worden.

An jüngeren Sproßzellen der Hefe, welche mit der **Mutterzelle** noch in Verbindung stehen, ist keine Zellhaut sichtbar: sie erscheinen als eine unmittelbare Fortsetzung der hyalinen Hautschichte des Cytoplasmas. Bei der Behandlung mit wasserentziehenden Agentien, wie Alkohol, schrumpfen sie gleichmäßig zusammen. Die Zellhaut ist jedenfalls noch sehr dünn, elastisch und nur wenig von der Hautschichte des Cytoplasmas verschieden. Bei älteren Zellen, die bis zu etwa ein Drittel oder der Hälfte der Mutterzelle herangewachsen sind, erscheint die Hautschichte des Plasmas bei mittlerer Einstellung des Präparates unter dem Mikroskop von einer dunkleren Linie umzogen. Die Haut ausgewachsener Zellen hebt sich als eine mehr oder minder breite (bei gewöhnlicher Bierhefe meist nicht über 0,5 μ) nach innen und außen scharf begrenzte Linie ab. Sehr deutlich kann die nun dicker und etwas weniger elastisch gewordene Zellhaut sichtbar gemacht werden, wenn man wieder wasserentziehende Agentien, wie Alkohol, verdünnte Säuren und Alkalien oder Glycerin, auf die Zellen einwirken läßt. Der Zellinhalt schrumpft mehr oder minder stark und zieht sich von der Zellhaut, welche ihren Umfang kaum verändert, zurück. Die Zelle zeigt dann im mikroskopischen Präparat doppelte Umrisse, deren äußerer die Zellhaut und deren innerer die gleichmäßig mit dem Zellinhalt geschrumpfte Hautschichte des Cytoplasmas darstellt. Noch einfacher läßt sich die Bloßlegung der Zellhaut dadurch erreichen, daß man auf das Deckglas des mikroskopischen Präparates einen gelinden Druck ausübt, so daß die Zellen platzen und deren entleerte Hüllen als blasse Häutchen, welche häufig in der mannigfaltigsten Weise gefaltet sind, sichtbar werden. Ohne eine solche Vorbehandlung, also ohne weiteres erkennbar ist die Zellhaut bei den Dauerzellen oder Chlamydosporen der Hefe. Sie hebt sich hier von dem mit „Oelkörperchen" meist dicht erfüllten Inhalt scharf ab. Nach den Untersuchungen von H. Will (3) erreicht sie meist eine Dicke von 0,7—0,9 μ, ja in manchen Fällen sogar von 1 μ.

Die **Verdickung der Zellhaut** ist eine Schutzvorkehrung gegen ungünstige Einflüsse. Das Alter der Kulturen und die Beschaffenheit der Nährlösung scheinen auf die mehr oder minder starke Verdickung der Zellhaut von wesentlichem Einfluß zu sein. Hefenzellen mit stark verdickter Zellhaut und dem Charakter der Dauerzellen findet man nicht selten in den Gärungsbetrieben an den verschiedensten Stellen, wie beispielsweise in schleimigen Ueberzügen von Gärkellerwänden, vor. Regelmäßig treten sie in alten Würzekulturen in den Hautbildungen, insbesondere aber im sogenannten Hefenring (s. S. 12), in Kulturen mit Nährsalzlösung jedoch auch im Bodensatz auf. Ebenso bilden sie einen regelmäßigen Bestandteil der zentralen Partie der sogenannten Riesenkolonien, welche mit den Hautbildungen identisch sind, überhaupt von Gelatinekulturen. Bierwürzen mit einem hohen Extraktgehalt führen offenbar der Zellhaut der sie vergärenden Hefen reichliche Mengen von Bildungsmaterial zu, wodurch sie einen weitergehenden Aufbau als gewöhnlich und eine Differenzierung erfährt. Möglicherweise schützen sich hierdurch die an Nährlösungen von bestimmter Konzentration angepaßten Zellen gegen den Einfluß hochprozentiger Nährlösungen (s. S. 89).

Nägeli (2) berechnete unter der Voraussetzung, daß die Zellhaut zweimal, der Inhalt der Zelle sechsmal soviel Wasser enthält als Substanz, die Dicke der Membran einer 10 μ großen Bierhefenzelle mit 7,5—8 Proz.

Stickstoff zu 0.45 μ; für eine sehr stickstoffreiche (fast 12 Proz.) Oberhefe kann sie unter dieser Voraussetzung kaum 0,2 μ betragen.

C. Becker (1) hat die **Dicke der Zellhaut** von Betriebshefe für Münchener Lagerbier durch direkte Messung zu 0.5 μ bestimmt, hingegen von solcher, welche Bockbierwürze vergoren hatte, zu 0,7 μ und von solcher aus Salvatorbier mit noch höher konzentrierter Stammwürze zu 0,9 μ. Mit der Zunahme der Wandstärke steigt die Schwierigkeit der Durchdringung und sinkt also die Gärtätigkeit der Hefenzelle. Aus diesem Grunde kann auch zur Vergärung von hochprozentigen Würzen (Bockbierwürze) die Hefe nur wenigmal (3—4mal) verwendet werden, während sie in Würzen von gewöhnlicher Konzentration (Schenkbierwürze) meist noch gut funktioniert. Zur Vergärung der hochprozentigen (durchschn. 18-proz.) Salvatorbierwürzen wird die Hefe in der Regel nur einmal verwendet.

Die Behauptung, daß die Stärke und Dichte der Zellhaut bei den verschiedenen Hefenarten eine spezifisch verschiedene sei, wodurch sich auch deren Verhalten gegenüber den Zuckerarten erkläre, wird sich kaum beweisen lassen. Jüngst hat Henneberg (3) wenigstens für die beiden Gruppen der obergärigen und untergärigen Kulturhefen wieder angegeben, daß die Zellhaut eine verschiedene Beschaffenheit besitzt, und zwar soll sie bei den obergärigen Brennereihefen Rasse II und Rasse XII weich und dehnbar, bei den untergärigen und auch bei den obergärigen Bierhefen dagegen, soweit solche untersucht wurden, fester und weniger dehnbar sein. Diese Angaben stützen sich auf das Verhalten der Zellen bei Druck auf das Deckglas und bei Zusatz von wasserentziehenden Reagentien. Zu beweisen bleibt noch, ob unter allen Verhältnissen diese Verschiedenheit bestehen bleibt.

Die obergärige Hefe wird anders hergestellt als die untergärige und die obergärige Bierhefe anders als die Spiritushefe, und damit dürfte, wenigstens teilweise, die Verschiedenheit der Zellhaut begründet sein.

Jedenfalls besitzt die Haut im Gegensatz zu dem Zellinhalt eine sehr große Widerstandsfähigkeit. Sie bleibt fast stets bei der Selbstverdauung der Zellen geschlossen. Nur wenn gleichzeitig in abgestorbener Hefe celluloselösende Bakterien oder Schimmelpilze anwesend sind, wird sie aufgelöst. Die Zellhaut der untergärigen Hefe (fast niemals bei den übrigen) öffnet sich oft an dem spitzeren Ende da, wo eine Tochterzelle hervorgesproßt und die Zellhaut möglicherweise dünner ist. Um eine Auflösung durch Bakterien handelt es sich hier jedenfalls nicht.

In einem pathologischen Zustande scheint, wie ebenfalls Henneberg (4. 5) beobachtet hat, die Haut so dünn zu werden, daß die Zelle amöbenartig ihre Form wechselt. Manchmal ist die Bewegung verhältnismäßig schnell. Die kleineren (pseudopodienähnlichen) körnerfreien Ausstülpungen führen dagegen träge, aber deutliche Bewegungen aus. Diese Zellen entstehen in mittelstarken Konzentrationen der Eiweißzerfallprodukte, welche sich bei der Selbstverdauung der Hefe bilden. Die Amöbenformen sind meist nur von sehr kurzer Lebensdauer.

Bei sehr starker Verdickung der Haut der Dauerzellen ist zuweilen, wie H. Will (3) zuerst an Hefe und zwar zunächst bei Bierhefe, später (5) auch bei wilder Hefe, wie *S. Pastorianus III* Hansen, beobachtet hat, eine **Schichtung** wahrnehmbar. Noch deutlicher tritt sie bei Behandlung der Zellen mit konzentrierter Salzsäure hervor, wie überhaupt durch letztere vielfach erst eine Schichtung der Zellhaut in zwei Lamellen sichtbar wird. Zuweilen scheint diese auch aus

mehreren Schichten zusammengesetzt zu sein. Die toten Zellen zeigen bei starker Verdickung der Haut noch deutlicher als die lebenden nicht selten ohne Anwendung von Reagentien eine Schichtung in zwei Lamellen. O. Casagrandi (1), welcher allerdings nicht angibt, an welchen Hefenarten und insbesondere an welchen Zellen (Bodensatzhefe oder Hautformen) er seine Untersuchungen angestellt hat, was für die Beurteilung der Ergebnisse wichtig ist, kommt im wesentlichen zu den gleichen Anschauungen wie Will. Er konnte zwischen zwei deutlichen Schichten noch eine dritte erkennen. Die Schichtung konnte durch Osmiumsäure, einprozentige Chromsäure und Salzsäure deutlich gemacht werden und zwar bei ruhenden Zellen, bei welchen die Haut eine gewisse Dicke erreicht hat; ja sogar bei jungen Zellen, wenn die Haut außerordentlich dünn ist, will Casagrandi eine solche noch beobachtet haben. C. Becker (1) wies dagegen nach, daß bei gewöhnlichen Brauereihefen nach vollendeter Gärung, also bei ruhenden Zellen, eine Schichtung überhaupt nicht vorhanden ist, auch hat er in keinem Falle eine solche bei jüngeren Zellen wahrgenommen. Eine Schichtung der Zellhaut erfolgt erst im Falle eines Dickenwachstums bei Vergärung hochprozentiger



Fig. 37. Dauerzellen von untergäriger Bierhefe.

a, die äußere Schichte der Zellhaut beginnt sich abzuschälen. Zellinhalt reich an „Oelkörperchen“ und „Oeltröpfchen“.

b, die Zelle ist (aus unbekannten Gründen) abgestorben, bevor sie die hervorsprossende Tochterzelle ausbilden und durch eine Querwand abtrennen konnte. Die Ausstülpung der Tochterzelle erstreckt sich in diesem Falle über die ganze Breite der verhältnismäßig dünnen Querwand, durch welche die Mutterzelle von einer ihr an dieser Stelle aufsitzenden Dauerzelle getrennt war. Das tote Plasma zu Klumpen geballt. Die äußere Schichte der Zellhaut hat sich fast ganz abgelöst und umschließt die Zelle gleich wie der Kelch eine Blüte.

c, Dauerzelle, von welcher sich die äußere Schichte der Haut allseits abgelöst hat. Zwei Tochterzellen haben sich durch eine Querwand von der Mutterzelle abgegrenzt, bevor deren Haut verdickt wurde, sind jedoch frühzeitig abgestorben und sitzen der abgelösten äußeren Hautschichte auf. Die dritte Tochterzelle ist wie bei *b* an der dünnen Querwand hervorgesproßt, an welcher die Mutterzelle mit einer anderen Dauerzelle verbunden war. Die Sproßzelle starb ab, bevor sie von der Mutterzelle durch eine Querwand getrennt wurde. Die äußere Schichte der Haut hat sich rings um die junge Sproßzelle abgelöst.

, *b* und *c* aus einer alten Kultur in Pepton-Dextrin-Nährsalzlösung. — Vergr. ca. 2000. Nach Will.

Würzen und bei Ausbildung der Dauerzellen. Stets konnten jedoch nur zwei Schichten unterschieden werden. Von diesen löst sich, wie bei Bierhefe an den Dauerzellen und später bei den verschiedensten Hefenarten Will zuerst beobachtet hat, die äußere mit zunehmendem Alter der Zelle ab *(Fig. 37)*. Im einfachsten Falle erscheint die äußere Schicht an einer oder mehreren Stellen zerrissen und haben sich einzelne Stücke zwischen den Rissen abgelöst, oder die Hautschichten haben

sich an einzelnen Stellen voneinander getrennt und zeigt dann die innere im optischen Querschnitt der Zelle einen welligen Verlauf. Zuweilen ragt diese bei im übrigen gleichmäßigem Verlauf nur an einer oder wenigen Stellen nach dem Zellumen etwas stärker hervor, oder die äußere erhebt sich buckelförmig über den sonst regelmäßigen Umriß der Zelle. In anderen Fällen erscheint die äußere Hautlamelle ohne Zerreißung von der inneren völlig abgelöst, und gewinnt es dann den Anschein, als ob zwei Zellen, von welchen die innere unregelmäßige Umrisse zeigt, ineinander geschachtelt wären. In den weitaus meisten Fällen ist jedoch die äußere Hautschichte zerrissen und hängt in größeren oder kleineren Fetzen an der Zelle, da und dort noch mit der inneren Schicht in Verbindung stehend. Häufig hat die Ablösung der äußeren Hautschichte an der Stelle, an welcher eine Tochterzelle hervorgesproßt ist, begonnen und haben sich dann die Ränder der zerrissenen Hautschichte mit fortschreitender Ablösung konkav nach außen umgeschlagen. Die Haut der Tochterzelle erscheint dann als unmittelbare Fortsetzung der inneren Hautschichte der Mutterzelle. Nicht selten trennen sich jedoch auch eine oder mehrere Tochterzellen gleichzeitig mit der abgelösten Schichte von der Mutterzelle ab.

Die abgelöste äußere Hautschichte ist meist ziemlich stark und erreicht vielfach eine Dicke bis zu 0,5 μ. Die Stärke der inneren Schichte ist dagegen eine sehr wechselnde; meist ist jedoch die letztere im Verhältnis zur äußeren dünn. Die äußere Schichte scheint bis zu einem gewissen Grade widerstandsfähiger und weniger dehnbar als die innere zu sein.

Bei dem Wachstum der Hefe in Würze ist eine Trennung der Hautschichten verhältnismäßig seltener zu beobachten als bei Kulturen in Nährsalzlösungen.

Auch bei anderen „Sproßpilzen" kommt häufig eine Verdickung der Zellhaut mit Ablösung einer äußeren Schichte vor. Bei den typischen *Torula*-Arten, an welchen sie P. Lindner (1) schon früher, als sie bei den Bierhefen beobachtet wurde, gesehen hatte, ist sie nach meinen Untersuchungen fast regelmäßig anzutreffen. In älteren *Mycoderma*-Kulturen sind in der Regel derbere Zellen von kurz-ovaler und fast rundlicher Form mit starker Haut vorhanden. Ob dieselbe ähnlich wie bei den Dauerzellen geschichtet ist, muß erst noch geprüft werden.

§ 8. Das gelatinöse Netzwerk.

Mit dem Aufbau und der Beschaffenheit der Zellhaut steht wahrscheinlich, wenigstens teilweise, eine Erscheinung im Zusammenhang, welche Emil Chr. Hansen (1) zuerst beobachtet und als gelatinöses Netzwerk bezeichnet hat.

Sehr oft nimmt man die Erscheinung wahr, daß sich Hefenzellen mit Anilinfarben äußerlich mehr oder minder stark anfärben. Auch mit Jodreagentien treten zuweilen Färbungen auf, welche der Zellhaut als solcher nicht zukommen. Sehr häufig tritt diese Erscheinung an den Zellen aus Hautbildungen sowie aus älteren Riesenkolonien auf, wenngleich sie bei der gewöhnlichen Bodensatzhefe aus Kulturen in Nährflüssigkeiten sowie bei gewöhnlicher Bierhefe nicht gänzlich fehlt. Die Hefenzellen scheinen von einer mehr oder minder stark entwickelten Schleimhülle umgeben zu sein, in welche andere Substanzen aus der

Umgebung, wie Eiweißkörper, eingelagert sein können und wahrscheinlich die Reaktion mit Anilinfarben und Jod bedingen.

Diese Verschleimung tritt nach meinen (8) Beobachtungen an den Riesenkolonien von Bierhefe auf 10-proz. Würzegelatine in ausgedehntem Maße auf und kann schon ohne weiteres sichtbar werden. Ebenso erscheint sie auch bei anderen Organismen, wie bei *Torula* und verwandten Arten, und macht die Kulturflüssigkeiten fadenziehend, ja kann sie sogar zu völligem gelatinösem Erstarren bringen. Ob diese Erscheinung nur auf eine Verquellung und Verschleimung der Zellhaut oder wenigstens gewisser Schichten derselben zurückzuführen ist, läßt sich zurzeit nicht sagen; gleichwohl scheint diese Annahme manches für sich zu haben. Nicht unwahrscheinlich kommt in gewissen Fällen zu der Verschleimung der Zellhaut noch eine Absonderung von Schleimstoffen aus dem Inneren der Zellen hinzu.

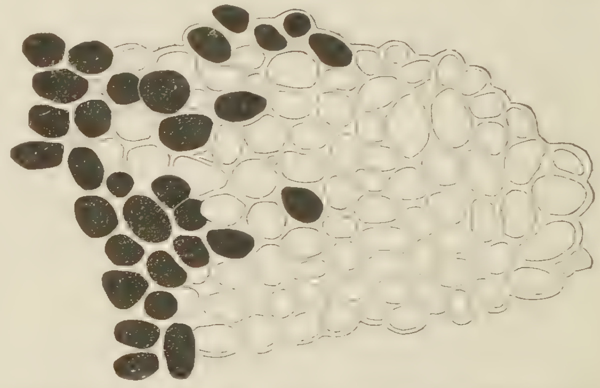


Fig. 38. Netzwerkbildung von *Carlsberg-Unterhefe Nr. 1.* Hansen.
Durch das Färben mit Methylviolett ist die Mehrzahl der Zellen aus dem Netzwerk fortgespült worden; nur 31 Zellen sind darin noch verblieben, kräftig gefärbt worden und zeigen sich so in der Figur satt schwarz. — Vergr. 1000. Nach Hansen's Original-Handzeichnung.

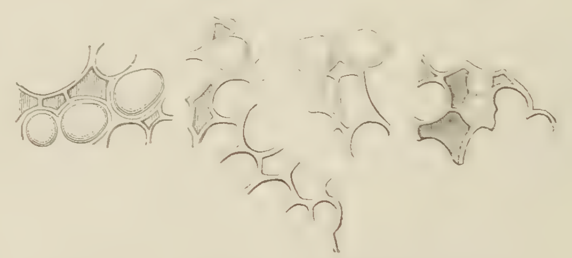


Fig. 39. Bruchstücke von gelatinösem Netzwerk einer Bierhefe. Ungefärbt. — Vergr. 1000. Nach Hansen's Original-Handzeichnung.

Im Jahre 1885 veröffentlichte E. Chr. Hansen (1) eine kurze Mitteilung, nach welcher es ihm gelungen war, festzustellen, daß bei den Saccharomyceten unter gewissen Bedingungen Bildungen auftreten, die sich wie ein gelatinöses Netzwerk zeigen, in dessen Räumen man dann die Zellen eingelagert findet (*Fig.* 38 und 39). Die ursprünglich zwischen diesen vorhandenen, aus den Kulturmedien stammenden Beimengungen können in die Substanz des Netzwerkes aufgenommen werden, wodurch zugleich eine Färbung desselben eintreten kann. Nicht selten findet sich dieses Netzwerk im Hefenring älterer Kahmhautkulturen und nach einer späteren Mitteilung von Hansen (2) aus dem Jahre 1886 auch in den Hautbildungen. Ebenso beobachtete er das Netzwerk bei der Sporenkultur auf dem Gipsblock und bei den Kulturen auf Gelatine sowie unter natürlichen Verhältnissen in Brennereien, Preßhefenfabriken und Brauereien.

Eine mikroskopische Untersuchung allein von frischer Hefe läßt in

keinem Falle direkt das gelatinöse Netzwerk ebensowenig wie durch Färbung erkennen. Dagegen finden sich wenigstens Spuren desselben fast regelmäßig in den Hefenproben, welche vielfach von den Gärungsbetrieben in der Größe einer Erbse zwischen Fließpapier getrocknet den Untersuchungslaboratorien zugeschickt werden und in Preßhefe vor. Nach Hansen kommt es beim Eintrocknen von dickbreiiger Hefe in kleinen Bechergläschen oder von dünnflüssiger Hefe auf dem Objektträger, welche von einer Glasglocke bedeckt sind, zum Vorschein. Um es leichter kenntlich zu machen, kann man sich der Färbung bedienen.

Soweit unsere Kenntnis des gelatinösen Netzwerkes reicht, sind bei diesem jedenfalls zwei Erscheinungen auseinanderzuhalten. Unzweifelhaft kann es durch Schleimbildung von seiten der Zellen allein zustande kommen und ist hierauf teilweise die Netzbildung in der Kahmhaut und im Hefenring alter Kulturen zurückzuführen, wo sie nach den Beobachtungen von Will (4) entweder direkt, wie in der Umgebung von Dauerzellen, sichtbar ist oder erst nach einer besonderen Präparation sichtbar gemacht werden kann. In diesem Falle können sich allerdings auch noch Eiweißkörper an der Bildung des Netzwerkes beteiligen. Im übrigen reagiert es nicht auf Jod, insbesondere tritt auch keine Blaufärbung ein, wie schon Hansen festgestellt hat. In sehr ausgedehntem Maß ist die Entwicklung eines gelatinösen Netzwerkes direkt in der zentralen Partie der Riesenkolonien zu beobachten.

Bei dem in eingetrockneter und in gepreßter Hefe auftretenden Netzwerk ist nach den Untersuchungen von Will (4) wahrscheinlich eine Verschleimung der Zellen selbst beteiligt, jedenfalls kommt aber in diesem Falle den der Hefe in stark aufgequollener, kolloidaler Form beigemengten Eiweißkörpern der Hauptanteil zu. Nach allen Beobachtungen scheint eine relativ große Menge dieser Eiweißkörper nötig zu sein, um das Netzwerk in scharf ausgeprägter Weise hervortreten zu lassen. Von diesem Netzwerk sind, worauf schon Hansen aufmerksam gemacht hat, die der Hefe beigemengten geformten Ausscheidungen, von welchen die „braunen Klümpchen" selbst Netzform oder eine schwammige, poröse Beschaffenheit besitzen können, auszuscheiden. Aber auch die sogenannten „Glutinkörperchen" können beim Trocknen der Hefe eine Form annehmen, wie sie Bruchstücke des Netzwerkes sehr häufig zeigen. Durch Essigsäure ist die Natur dieser sternförmigen Körperchen leicht nachzuweisen.

Bei der Bierhefe wird in der Regel das Netzwerk vom Oberzeug, von der obersten Schichte der im Gärbottich abgesetzten Hefe, stärker und kräftiger entwickelt als von der Kernhefe, der mittleren, während der Hauptgärung abgesetzten Hefe. Sehr oft (zehnmal innerhalb 24 Stunden) gewaschene Bierhefe bildet kein Netzwerk mehr. Auch nach längerem Stehen konnte von Will im Gegensatz zu den Angaben von Hansen in diesem Falle ein Netzwerk wie bei der ursprünglichen Hefe nicht mehr erhalten werden.

In ganz vorzüglicher Weise wird das Netzwerk entwickelt, wenn man Bierhefe auf einem Objektträger in sehr dünner Schichte ausbreitet und soweit eintrocknen läßt, daß beim Auflegen eines Deckglases eine dünne Hefenschichte an diesem hängen bleibt (Klatschpräparat). Man läßt letztere scharf an der Luft trocknen und legt dann das Deckglas trocken auf einen Objektträger. Hierauf läßt man konzentrierte Zuckerlösung unter das Deckglas fließen, wodurch das Netzwerk überall sehr deutlich hervortritt. Durch Heben des Deckglases können die Zellen

leicht aus demselben entfernt werden, und es kommt dabei in guten Präparaten das Netzwerk in seiner ganzen Ausdehnung zum Vorschein. Der gleiche Erfolg, und zwar noch sicherer, wird erreicht, wenn man nach der Zuckerlösung eine wäßrige Methylviolettlösung unter dem Deckglas durchsaugt.

Nicht zu verwechseln mit diesen beiden Formen von Netzwerkbildung sind häutige Ausscheidungen an der Würzeoberfläche in Kulturen, welche in der Umgebung von Hefenzellen Netzform annehmen können; diese geben ebenfalls Eiweißreaktion. Erwähnt mögen auch noch eigentümliche kristallinische Ausscheidungen sein, welche Will fast regelmäßig in den Kahmhäuten und im Hefenring seiner untergärigen Bierhefen angetroffen hat und welche ebenfalls vielfach in Form eines feinen Netz- und Flechtwerkes zwischen den Hefenzellen auftreten.

Nicht ausgeschlossen ist, daß die Verschleimung der Zellmembran der Hefe direkt oder indirekt (durch Einlagerung und Bindung von Niederschlägen eiweißartiger Natur, welche mit fortschreitender Gärung entstehen) bei der sogenannten Bruchbildung (s. 6. Kap. d. V. Bds.), bei welcher die Zellen, und zwar auch solche, welche von verschiedenen Mutterzellen abstammen, zu kleinen Klümpchen fest verbunden und miteinander verklebt werden, beteiligt ist.

Die Befreiung der Hefe von schleimigen Bestandteilen, wie sie in den verschiedenen Formen des Netzwerkes zutage treten, werden in dem Falle unerläßlich sein, wenn es sich um eine quantitative chemische Analyse von Hefe handelt, durch welche man Aufschluß über die Zusammensetzung der Hefenzelle selbst zu gewinnen sucht. Eine solche Reinigung ließe sich durch starkes Wässern zwar ziemlich gut erreichen, jedoch werden hierdurch gleichzeitig auch die Zellen verändert und damit die Ergebnisse der Analysen in ihrem Wert herabgedrückt.

§ 9. Chemische Zusammensetzung der Zellhaut. Mikrochemische Reaktionen derselben.

Ueber die chemische Beschaffenheit der Stoffe, aus welchen die Zellmembran aufgebaut ist, läßt sich noch nicht viel Zuverlässiges angeben. Von einer (nach dem heutigen Stande unserer Kenntnis für hinfällig zu erklärenden) gegenteiligen Behauptung J. Schlossberger's (1) abgesehen, sind sowohl Mulder (1) als auch später C. van Wisselingh (1) zu der Feststellung gelangt, daß echte Cellulose fehlt. Das eine war schon lange bekannt, daß die für die Cellulose der höheren Pflanzen charakteristischen mikrochemischen Reaktionen an den Zellhäuten der Hefe nicht auftreten. Die Annahme, daß infolge Durchsetzung der Zellhaut mit anderen Substanzen insbesondere eiweißartiger Natur die Cellulosereaktion verdeckt würde, erwies sich als hinfällig. Nach dem gewöhnlichen Verfahren der Cellulosedarstellung mit Lauge und Säuren Monate hindurch behandelte Bierhefe gibt niemals Cellulosereaktion. Daß das Kupferoxydammoniak ohne merkliche Wirkung auf die Hefenzelle ist, war schon durch Liebig beobachtet worden. Die Annahme de Bary's, daß die Zellhaut der Pilze aus einer besonderen Modifikation der Cellulose, der Pilzcellulose, bestehe, herrschte lange Zeit (s. Bd. I, S. 229).

Auch der zweite der Stoffe, welche als Bausteine für die Zellhaut der Eumyceten im allgemeinen eine Rolle zu spielen scheinen, nämlich das Chitin, scheint nach den übereinstimmenden Ergebnissen der von

C. van Wisselingh und von Tanret (1) angestellten Untersuchungen bei den Hefen zu fehlen. Letzterer fand als Hauptbestandteil der Zellhaut der Bierhefe einen von ihm als Fungose bezeichneten Körper, während Mangin (2) den von ihm aufgefundenen einzigen Bestandteil der Zellhaut der Saccharomyceten Callose benannt hat (s. Bd. 1, S. 233). 5

Die Zellhaut von *Mycoderma*, *Saccharomyces anomalus* und *Sacch. membranaefaciens* färbt sich nach den Untersuchungen von Will (7) selbst an jugendlichen Kulturen mit einprozentiger Osmiumsäure schwarzbraun, also zu einer Zeit, zu welcher die blassen Zellen „Oelkörperchen" (s. § 15) nicht aufweisen. Bei den meisten Hefenarten beobachtet man 10 eine derartige Färbung nicht. Das Verhalten der Haut der *Mycoderma*-Zellen und der genannten Hefenarten führt zu dem Schluß, daß in bzw. auf derselben Substanzen abgelagert sind, welche sich wie Fette oder Oele verhalten. Die auf Osmiumsäure reagierende Substanz kann durch Behandlung der Zellen mit Alkohol entfernt werden. In diesem Zu- 15 sammenhang sei auch erwähnt, daß die Zellhaut von *Mycoderma*, *S. anomalus* und manchen *Torula*-Arten, welche sich wie die erstgenannten in Form von Häuten auf der Oberfläche von Flüssigkeiten entwickeln, meist von einer „Lufthülle", deren Natur noch nicht bekannt ist, umkleidet wird. Durch diese Lufthülle erhalten die Zellen ein charak- 20 teristisches Gepräge.

Die von Curtis (1) an einem pathogenen Sproßpilz angeblich gemachte Beobachtung der Violettfärbung von dessen Membran durch Chlorzinkjod ist von Casagrandi (1) als ein Irrtum erklärt worden. Auch die einfache Jodlösung ruft an der Haut der vegetativen Zellen der 25 Hefen höchstens eine schwache Gelbfärbung hervor und es ist dann noch fraglich, ob nicht diese Reaktion auf Körper, welche die etwas verquollene und verschleimte Zellhaut nachträglich in sich aufgenommen hat, zurückzuführen ist. Die schon von mehreren Beobachtern gemachte Angabe, daß die Sporenmembran bei manchen Hefen durch Chlorzinkjod 30 stark gelb- bis gelbbraun gefärbt werde, ist zufolge einer Bemerkung von Will (5) dahin zu berichtigen, daß der Sitz dieser Färbung nicht die Sporenmembran selbst, sondern ein ihr aufliegender, unverbrauchter, mit Glycogen durchsetzter Rest des Plasmas der Mutterzelle (Epiplasma de Bary's) ist. Insbesondere an der einen der von ihm beschriebenen 35 zwei Arten von wilder Hefe, bei welchen die Färbung eine rotbraune war, hat er dies feststellen können. Ein auffälliges Verhalten, das jedoch nicht ohne Analogie ist, weist zufolge Lindner's (2) Beobachtung der *Schizosaccharomyces octosporus* auf. Die Haut seiner Sporen und manchmal auch der vegetativen Zellen wird durch Jod-Jodkalium kräftig gebläut. 40 Das gleiche beobachtete J. Ch. Holm an einer anderen, der vorgenannten nahestehenden Species. Möglicherweise handelt es sich hier um eine ähnliche Erscheinung, wie ich sie an sehr stark verdickten Partien der Zellhaut eines in Nährsalzlösung gezogenen Mycels von *Aspergillus Oryzae* beobachtet habe; diese färbten sich ebenfalls mit Jod-Jodkaliumlösung 45 intensiv blau. An den Sporen von *S. Ludwigii* habe ich bei der Behandlung mit der gleichen Jodlösung zuweilen eine mehr oder minder deutlich ausgesprochene blaugrüne Färbung ähnlich derjenigen, welche man manchmal bei *Bacterium Pasteurianum* Hansen erhält, beobachtet. Die letztere Reaktion ist möglicherweise durch eine Mischfärbung von 50 blaugefärbten Sporenhäuten und der gelben Jodlösung bedingt. Diesen Ausnahmefällen zuzuzählen ist wohl die Blaufärbung, welche Liebermann und von Bittó (1) an einem von ihnen auf makrochemischem Wege

gewonnenen Präparat von sogenannter Hefencellulose bei Zufügung von Chlorzinkjod haben eintreten sehen. In betreff des Verhaltens der Zellhaut gegen Farbstoffe hat CASAGRANDI (1) bemerkt, daß sie sich mit Rocellin und Crocein in saurer Lösung, Congorot in alkalischer Lösung, Congorot nach vorheriger Einwirkung von Salzsäure und des SCHWEIZER'schen Reagens (STRASBURGER) ebensowenig wie mit dem 14-proz. Hämatoxylin von GILTAY färbt, daß hingegen mit dem Methylenblau von EHRLICH und dem HANSTEIN'schen Anilingemisch sich gute Färbung erreichen lasse. C. BECKER (1) hat jedoch von diesen beiden nur letzteres für wirksam befinden können und zwar in keinem Fall direkt, auch nach Tagen nicht. Der Farbstoff ist von der Zellhaut leicht abwaschbar.

Auflösung der Haut tritt ein, wenn die Zellen in konzentrierte Chromsäure oder in konzentrierte Schwefelsäure gebracht werden. Andere Säuren sind dazu untauglich.

Von den Alkalien ruft Kali- und Natronlauge nur eine Quellung und eine Aufhellung hervor. Bei Anwendung des SCHULZE'schen Macerationsgemisches (Salpetersäure und Kaliumchlorat) beobachtet man immer nur ein Durchsichtigwerden der Zellhaut.

Sowohl die bisher genannten wie auch noch eine Reihe anderer mikrochemischer Reaktionen haben CASAGRANDI (1) zu der Meinung gebracht, daß in der Haut der Hefenzellen sich ein Stoff vorfindet, welcher in chemischer Hinsicht dem von MANGIN (1) als Bestandteil anderer pflanzlicher Zellhäute erkannten Pektin nahesteht. Darüber zu entscheiden, ob und inwieweit dies zutrifft, ist um so schwieriger, als ja die Kennzeichnung dieses Kohlenhydrates noch unzulänglich ist. Noch mißlicher steht es um die Frage nach der Verschiedenheit der chemischen Zusammensetzung der einzelnen Schichten der Zellhaut. Denn daß eine solche besteht, darf man aus der von WILL gemachten und von CASAGRANDI bestätigten Beobachtung schließen, derzufolge bei Einwirkung einer zur Hälfte mit Wasser verdünnten, sehr konzentrierten Chromsäure die innere Schichte der Zellhaut der Dauerzellen früher aufgelöst wird als die äußere. Durch eine ähnliche Beobachtung mögen wohl NÄGELI (2) und NÄGELI und SCHWENDENER (1) zu der von ihnen ausgesprochenen Meinung gebracht worden sein, daß die Haut der Hefenzellen, welche an der Oberfläche der Nährflüssigkeit hatten bleiben und dort mit sauerstoffhaltiger Luft in Berührung treten, cuticularisiert sei. Möglicherweise ist die innere Schichte der Zellhaut die Quelle des in dem gelatinösen Netzwerk in die Erscheinung tretenden Schleimes. Der Sproßpilzschleim, welchen NÄGELI und LOEW (1) in den von lebender Hefe in verdünnter Phosphorsäure und von toter Hefe durch Kochen ausgeschiedenen Stoffen fand, stammt nach der Anschauung dieser Autoren aus der Zellhaut er soll ein Umwandlungsprodukt derselben sein. Sehr wahrscheinlich ist er kein einheitlicher Körper und enthielt vielleicht, nach seinem Verhalten gegenüber Jod zu schließen, Glycogen. Auch das Dextran, welches WEGNER (1) aus Hefe dargestellt hat, ist möglicherweise ein Umwandlungsprodukt der Zellhaut.

Die auf das Ergebnis der mikrochemischen Prüfung begründete Vermutung, daß die Zellhaut aus verschiedenen Modifikationen der gleichen Substanz zusammengesetzt sei, erhält eine Stütze an den durch SALKOWSKI (1) angestellten makrochemischen Untersuchungen, doch ist auch in diesem Falle zu berücksichtigen, daß hier Umwandlungen bei der Darstellung nicht ausgeschlossen sind.

Die von ihm gewonnene Hefencellulose ließ sich in zwei, der Menge

nach etwa gleiche Bestandteile zerlegen: in einen löslichen und in einen unlöslichen. Ersteren bezeichnet er als Erythrocellulose, da er sich durch Jodjodkalium wie das Glycogen kräftig rotbraun färbt. Schon Laurent (1) hatte angegeben, daß in der Zellhaut der Hefe zuweilen ein Körper vorhanden sei, der sich gegenüber diesem Reagens wie Glycogen verhält. Den unlöslichen Bestandteil bezeichnet Salkowski als Achroocellulose, weil er mit Jod keine Reaktion mehr gibt (s. Bd. I, S. 231—232).

Schützenberger und Destrem (1) hatten schon im Jahre 1879 durch Behandlung des in verdünnter Kalilauge unlöslichen Rückstandes von Hefe, welcher zunächst nicht die Merkmale und Zusammensetzung der Cellulose besaß, durch Einwirkung von konzentrierter Kalilauge ein Spaltungsprodukt von der Zusammensetzung $C_9H_{16}O_5$ erhalten, welches sie als der Cellulose homolog ansehen.

Das eine wird aus dieser Feststellung klar sein: die Zellhaut der Hefe ist nicht nur in anatomischer sondern auch in chemischer Hinsicht ein zusammengesetztes Gebilde. Bis jetzt ist es auch nicht gelungen, die sogenannte Hefencellulose frei von Aschenbestandteilen und von Stickstoff zu erhalten. Von den ersteren fand Schlossberger noch immer 1,0 Proz. Die von E. Salkowski dargestellten Präparate enthielten zwischen 1,7 und 2,6 Proz. Asche. Liebermann und von Bittó fanden in den ihren 1,8 Proz. Ueber die Bedeutung dieser anorganischen Bestandteile der Hefenzellhaut auch nur bloße Vermutungen aufzustellen, ist um so weniger zulässig, als man noch nicht einmal die Zusammensetzung dieser Zellhautasche kennt. Uebrigens ist auch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß jene erst durch das Auslaugeverfahren eingeführt und in der Zellhaut festgelegt worden ist. In betreff des Stickstoffgehaltes der Hefenzellhaut kann man gleiche Einhelligkeit in den Befunden der verschiedenen Forscher nicht feststellen. Während Schlossberger ihn nicht unter 0,5 Proz. verringern konnte und auch E. Salkowski ungefähr bis zu dieser Grenze gelangte, wollen ihn sowohl Mulder als auch Nägeli und Loew (2) bis auf eine Spur beseitigt haben, allerdings unter Anwendung von Agentien (z. B. warme, starke Salzsäure), denen gegenüber nur wenige Körper unzersetzt sich zu behaupten vermögen.

§ 10. Allgemeines über die Methoden des Nachweises des Zellkernes der Hefen. Aeltere Angaben über den Zellkern.

Das Vorhandensein eines Zellkernes in den verschiedenen Hefenarten darf bei der Uebereinstimmung vieler und zuverlässiger Forscher wohl nicht mehr in Zweifel gezogen werden. Die Angaben der verschiedenen Autoren stützen sich teils auf den Nachweis von Nuclein, teils auf die direkte Beobachtung an lebenden Zellen, zum größten Teil jedoch auf nach verschiedenen Methoden gefärbte Präparate von ruhenden, sprossenden, sowie sporenbildenden Zellen.

Gewöhnlich übertrifft das Lichtbrechungsvermögen des Kernes dasjenige des Cytoplasmas nur wenig. In ruhenden, mit stark lichtbrechenden Reservestoffen erfüllten Zellen wird er durch diese verdeckt und kann nicht direkt beobachtet werden. Hierzu kommt noch die geringe Größe der Zellen und dementsprechend die geringe Größe des Zellkernes, sowie unter Umständen die Gegenwart einer sehr großen

Anzahl verschiedener in der Zelle zerstreuter Inhaltskörper, welche das Auffinden des Zellkernes sehr erschweren. Zu einer Zeit, in welcher die optischen Hilfsmittel von geringerer Leistungsfähigkeit waren, entzog sich der Zellkern sogar dem Auge geübter Mikroskopiker. Während 5 Nägeli (1) schon im Jahre 1844 in den Zellen von Wein- und Bierhefe „ein der Membran anliegendes kleines Kernchen von weißlichem Schleime" oft bemerkt und Schleiden (1) im Jahre 1849 diese Angabe bestätigt hatte, versicherte noch im Jahre 1861 Ernst Brücke (1), daß ihm eine solche Beobachtung bisher nicht geglückt sei, und wies auf die Möglich- 10 keit der Verwechslung des Zellkerns mit anderen Inhaltskörpern hin. Welchen der schärfer sich abhebenden Inhaltsbestandteile der Hefenzellen Nägeli für den Kern ansprach, läßt sich kaum mehr feststellen. In den meisten Fällen wurden jedoch später die von demselben als Kerne gedeuteten Gebilde als Vakuolen, Fettropfen und dergleichen erkannt.

15 Von neueren Forschern hat E. Chr. Hansen (3) die Angabe gemacht, daß er den Zellkern auch ohne Färbung mehrmals in den Hautzellen von *Sacch. Pastorianus I* und *II* sowie *S. ellipsoideus I* beobachtet habe, wenn die Zellen in einen Wassertropfen oder in das Glyceringemisch von Hantsch gebracht wurden. Auch Moeller (1) will den Zellkern 20 häufig in lebenden Zellen als ein wenig glänzendes, im Vergleich zum Cytoplasma gleichmäßig homogenes, blaßrötliches Gebilde gesehen haben, welches in den Zellen, in denen es sich überhaupt deutlich vom Plasma abhob, auch sofort durch seine Größe auffiel. Er spricht die Vermutung aus, daß der Kern von gelegentlichen Beobachtern für eine Vakuole 25 gehalten worden sei. Mir selbst ist es bei Untersuchung der Inhaltsbestandteile niemals gelungen, in der Gärungsform und in den Hautzellen von untergärigen, in Bierwürze gezüchteten Bierhefen irgend welche Gebilde zu finden, welche als Zellkern hätten gedeutet werden können. Geeigneteres Material für das Studium der Inhaltsbestandteile der Hefen- 30 zellen scheinen die Kulturen in mineralischen Nährlösungen zu bieten. Bei einer obergärigen, in Würze vermehrten Bierhefe, bei welcher die Mehrzahl der Zellen in der Sporenbildung begriffen war, habe ich dagegen deutlich ein durch Plasmafäden gestütztes Körperchen gesehen, das als Kern angesprochen werden konnte. Auch Buscalioni (1) und 35 A. Wilhelmi (1) geben an, daß sie bei *Saccharomyces guttulatus* ohne Färbung einen ungefähr in der Mitte an der Wand gelegenen Kern gefunden haben, der eine rundliche Masse von etwas stärkerem Lichtbrechungsvermögen als dem des Plasma darstellte.

Einen wichtigen Schritt vorwärts machte das Studium der Kernfrage, 40 als die bis dahin auf zoologischem Gebiete mit so großem Erfolg verwendeten mikrochemischen Färbeverfahren auch auf die Erforschung der Pflanzenzelle übertragen wurden und später die Färbemethoden insbesondere in der Bakteriologie zu hoher Ausbildung gelangten. Mit den großen Vorteilen, welche die Färbeverfahren mit sich brachten, 45 mußten jedoch auch die mannigfachen Nachteile, welche denselben anhaften, mit in den Kauf genommen werden. Die Schrumpfungen, Ausscheidungen und Niederschläge, welche die „Fixierung" der zarten Präparate bei erhöhter Temperatur und durch die Behandlung mit Reagentien erfahren, gebieten die größte Vorsicht in der Deutung der 50 an den gefärbten Präparaten auftretenden Erscheinungen, welche unter Umständen einer lebhaften Phantasie den weitesten Spielraum lassen. Es ist daher für die Beurteilung der Untersuchungsresultate wichtig, die jeweils angewendete Fixierungsmethode kennen zu lernen.

Die Tinktionsverfahren beruhen darauf, daß der Zellkern gewisse Farbstoffe einerseits viel schneller aufnimmt, andrerseits beim Auswaschen viel länger zurückhält als das Cytoplasma mit seinen übrigen Einschlüssen.

Bei den durch Färbung gewonnenen Differenzierungen ist zu be- 5 achten, daß es nach den Untersuchungen von A. Fischer (1) spezifische Kernfarbstoffe nicht gibt. Ebenso gewagt dürfte auch die Bestimmung der den Kern und das Plasma der Zelle zusammensetzenden Eiweißkörper nach Färbungsverfahren oder nach den bei der Behandlung mit Verdauungsflüssigkeiten verbleibenden Rückständen sein. Starke oder meta- 10 chromatische Färbung sagt weder über die Zugehörigkeit zu irgend einer Gruppe von Eiweißkörpern noch über den morphologischen Wert eines Zellelementes irgend etwas aus. Mit Hämatoxylin und allen anderen Farben färben sich allerdings in tierischen und pflanzlichen Geweben die Kerne besonders stark, aber ein espezifische Reaktion liegt hier nach 15 A. Fischer sicher nicht vor.

Schwierigkeiten für den Nachweis des Zellkernes bietet die Affinität des Cytoplasmas für Farben, verbunden mit der Gegenwart in der Zelle zerstreuter Inhaltskörper, die ebenfalls fähig sind, Farbstoffe aufzuspeichern. In letzterem Falle handelt es sich darum, ob Differenzen 20 in der Tingierbarkeit zwischen beiden vorhanden sind und ob der Kern eine bestimmte Struktur zeigt. Weiter wird für die Kernnatur des gefärbten Körpers von Bedeutung sein, ob sich derselbe bei der Sprossung und Sporenbildung in einer für den Zellkern charakteristischen Art beteiligt. 25

Eine gewisse Schwierigkeit in der Beurteilung der von verschiedenen Forschern erhaltenen Ergebnisse liegt auch darin, daß meistens nur ungenaue und nur annähernde Angaben bezüglich der Konzentration der Farblösung, der Temperatur und der Dauer der Einwirkung vorliegen.

Fr. Schmitz (1) gelang es im Jahre 1879 zuerst, in Zellen von 30 *S. cerevisiae* und *Mycoderma vini* je einen Zellkern nachzuweisen, der in der Mitte der Zelle neben den großen Vakuolen dem Plasma eingelagert war. Nach der Härtung der Zellen durch Einlegen in gesättigte Pikrinsäurelösung, sorgfältiges Auswaschen, Behandlung mit Hämatoxylin-Auflösung und wiederholtes Auswaschen trat ein gebläutes Körperchen 35 hervor, das sich von dem ungefärbten, umgebenden Plasma sehr gut abhob und also in dieser (wie auch in mancher anderer) Hinsicht ein ähnliches Verhalten aufwies wie der Kern der tierischen Zellen.

Strasburger (1) bestätigte im Jahre 1884 die Angaben von Schmitz. Begann hierdurch die Frage nach dem Zellkern der Hefen bestimmtere 40 Formen anzunehmen, so ließ doch das angewendete Färbungsverfahren immer noch genug Zweifel übrig. Strasburger machte schon darauf aufmerksam, daß der Nachweis des Zellkernes durchaus nicht leicht sei, und in der Tat geht die Färbung nicht immer so glatt und sauber vonstatten, daß keine Bedenken über die Deutung der durch dieselbe schärfer 45 hervortretenden Elemente des Zellinhaltes bestehen könnten. Gut gelungene, nach der Methode von Schmitz gefärbte Präparate geben jedoch nach meinen eigenen Erfahrungen recht überzeugende Bilder, und bin ich im Besitz von Präparaten ruhender untergäriger Bierhefenzellen, welche im Jahre 1886 angefertigt wurden und heute noch den Zellkern 50 insbesondere da sehr gut erkennen lassen, wo Täuschungen durch geschrumpfte Vakuolen ausgeschlossen sind.

Wenn wir von gelegentlichen Beobachtern absehen, so fanden die

Angaben von SCHMITZ eine Bestätigung durch E. CHR. HANSEN (3), A. ZALEWSKI (1), E. ZACHARIAS (1), H. MOELLER (1—3), P. A. DANGEARD (1), FR. BUSCALIONI (1), FR. A. JANSSENS (1), H. WAGER (1), BOUIN (1), MARPMANN (1), C. HOFFMEISTER (1), L. FEINBERG (1), A. HIRSCHBRUCH (1) 5 und A. GUILLIERMOND (1—4). In jüngster Zeit haben RAÝMAN und KRUIS (1) einige Mitteilungen über den Kern der Hefenzellen gemacht, und glaube ich, daß letztere, wenn sie auch nur ganz kurz sind, um so weniger übergangen werden dürfen, als diese beiden Forscher außer einer besonderen Präparationsmethode eine Neuerung in die Beobachtung in- 10 sofern einführen, als sie die gefärbten Präparate bei 3000-facher Vergrößerung photographieren. Es ist zu hoffen, daß auf diesem Wege mit der Zeit neue Aufschlüsse bezüglich der Kernfrage und Strukturverhältnisse der Hefenzelle erhalten werden.

Gegenüber dieser großen Anzahl von positiven Angaben steht nur 15 eine kleine, welche die Gegenwart eines Zellkernes entweder völlig in Abrede stellen oder sich den durch Färbung erhaltenen Bildern gegenüber skeptisch verhalten.

FR. KRASSER (1) führte gleichzeitig mit den Färbemethoden, welche von den verschiedenen Autoren angegeben sind, eine mikrochemische 20 Untersuchung auf Nuclein durch. Da nach letzterer der als Zellkern angesprochene Inhaltskörper kein Nuclein enthielt, trotzdem aber Nuclein in den Bierhefenzellen nachgewiesen war, so schließt KRASSER, daß derselbe weder in morphologischer noch in chemischer Beziehung ein normaler Zellkern sein könne, eine Schlußfolgerung, die angesichts des durchaus 25 unzureichenden Nachweises von Nuclein als zu weitgehend bezeichnet werden muß.

Den Untersuchungen von SIDDY EISENSCHITZ (1) ist für die Kernfrage nur ein geringer Wert beizumessen. Sie gelangte zu einem ähnlichen Ergebnis wie KRASSER. Die Hefenzellen (hauptsächlich von käuflicher 30 Preßhefe) enthalten keinen eigentlichen Kern, schließen aber aus Nuclein bestehende Körnchen ein, die namentlich durch Färbung mit Benzopurpurin gut sichtbar gemacht werden können.

Die Arbeit von RAUM (1), welche sich hauptsächlich mit den später zu besprechenden stark lichtbrechenden Körperchen (Granula) der Zellen 35 von *S. cerevisiae I*, *S. ellipsoideus I* und *II*, *S. Pastorianus I*, *S. cerevisiae* (aus Preßhefe) und anderen Sproßpilzen beschäftigt, ist von rein bakteriologischen Anschauungen beeinflußt, und stellte er auch die Präparate, welche mit LOEFFLER'scher Methylenblau-Lösung und kalter Lösung von Bismarckbraun gefärbt wurden, nach bakteriologischen Methoden her. 40 RAUM ist ebenfalls zu der Behauptung geneigt, daß die Hefenzellen keinen Kern im eigentlichen Sinne des Wortes besitzen und spricht die Anschauung aus, daß die bisher als Zellkerne angesprochenen Gebilde wahrscheinlich mit gewissen schwarzen Kügelchen identisch seien, welche in den Hefenzellen durch Hämatoxylin nach vorausgegangener Alkohol- 45 behandlung sichtbar gemacht werden können.

HIERONYMUS (1), welcher Preßhefe mit Karmin färbte, fand keinen Zellkern und glaubt, daß er auch bei sämtlichen zur Gattung *Saccharomyces* gestellten Arten fehlt. Als Aequivalent des Kernes betrachtet er den aus Granulationen zusammengesetzten Zentralfaden (s. § 15). 50 Er steht also auf einem ähnlichen Standpunkt wie KRASSER und EISENSCHITZ.

MACALLUM (1) kam auf einem anderen Weg dazu, die Existenz eines Zellkernes in Abrede zu stellen. Er beobachtete zwar in jeder Zelle

von *S. cerevisiae* nach der Fixierung mit FLEMMING'scher Lösung (s. Bd. I, S. 158) und Färbung mit Hämatoxylin ein kleines Körperchen, welches dem von anderen Forschern beschriebenen Zellkern entsprach. Da es sich jedoch nicht mit Safranin färbte und mit Hämatoxylin nach der Fixierung mit Sublimat differenziert werden konnte, so bezweifelt er die Nucleinnatur desselben. Die Reaktion auf Eisen, welche er für ein Kennzeichen des Zellkernes hält, läßt ihn bei *S. Ludwigii* darauf schließen, daß hier das Nuclein im ganzen Plasma verteilt und infolgedessen auch kein Zellkern vorhanden sei.

ZIMMERMANN (1) beobachtete zwar an einem Alkohol-Hämatoxylinpräparat bei Anwendung starker Objektive und des vollen Strahlenkegels des ABBE'schen Beleuchtungsapparates einen dunkler gefärbten Körper, dessen Kernnatur ihm jedoch noch nicht vollständig sichergestellt erschien, obwohl man ihn aus Analogie mit den übrigen Pilzen für einen Zellkern halten könne. Später gibt er (2) jedoch an, daß GÖRTZ am besten den Kern der Hefenzellen durch Fixierung mit MERKEL'scher Flüssigkeit und Färbung mit Fuchsin und Methylenblau sichtbar machen konnte.

Die meisten Forscher, welche positive Angaben über die Gegenwart eines Zellkernes in den von ihnen untersuchten Hefenarten machen, benutzten zur Differenzierung nach den Angaben von SCHMITZ Hämatoxylin. So HANSEN, der sich durch den Vergleich mit Präparaten von SCHMITZ davon überzeugte, daß er die gleichen blau gefärbten Körperchen wie SCHMITZ vor sich gehabt hatte. Später fand er noch, daß man bei Behandlung der Zellen mit Osmiumsäure und Einbetten derselben in verdünntes Glycerin viel leichter und ebenso gute Präparate wie nach dem anderen Verfahren erhält.

Die Angaben von ZALEWSKI, welcher die Hefe mit Hämatoxylin und Alaunlösung behandelte, müssen wohl, wenigstens bei der Frage nach dem Zellkern, völlig ausscheiden. Schon WIESNER (1) hat die von ZALEWSKI in Weinhefenzellen als Zellkern angesprochenen Gebilde als die plasmatischen Hüllen der Vakuolen, als die geschrumpfte Vakuolenhaut gedeutet. Aus den der Abhandlung von ZALEWSKI beigegebenen Zeichnungen läßt sich allerdings nur wenig ersehen, doch machen die *Fig. 25* bis *27* den gleichen Eindruck wie die toten von Glycogen dicht erfüllten Zellen mit geschrumpfter und zusammengedrückter, in der Mitte oder seitlich liegender Vakuole, welche WILL (1) später beschrieben hat (vgl. *Fig. 43* auf S. 66). Die Aehnlichkeit dieser geschrumpften Vakuole nach Aussehen und Lage mit einem Zellkern ist nicht selten eine sehr große. Nach meinen eigenen Beobachtungen bildet der Zellkern von ZALEWSKI einen meist wandständigen, anscheinend von dem plasmatischen Wandbelag überzogenen, dichteren, glänzenden Körper von Linsenform, der dem Beobachter entweder die schmale oder die breite Seite zukehrt und in das Lumen der Zelle, die anscheinend von einer großen Vakuole erfüllt ist, hineinragt. Die Reaktion mit Jod zeigt aber, daß die scheinbare Vakuole nur das stark aufgequollene Glycogen der toten Zelle darstellt. Der „Nucleolus" ist entweder ein letzter Rest der Höhlung der Vakuole oder ein von derselben im lebenden Zustand der Zelle eingeschlossenes stark lichtbrechendes Körperchen. Mit diesen Beobachtungen stimmt auch die Angabe von ZALEWSKI überein, daß der Durchmesser des Zellkerns, in welchen er auch einen „Nucleolus" erkannte, ein Viertel bis ein Drittel des Zelldurchmessers betrage.

Nach Extraktion von Bierhefe mit Aether-Alkohol und Färbung mit

der GRENACHER'schen Hämatoxylinlösung konnte ZACHARIAS die Angaben über das Vorkommen eines Zellkernes bestätigen. Verdauungsflüssigkeit ließ jedoch den Zellkern nicht deutlich hervortreten.

Zum Fixieren der untersuchten Weißbierhefenzellen benutzte MOELLER 5 einprozentige oder zehnfach verdünnte, mit Jod gesättigte Jodkaliumlösung und behandelte die Präparate zunächst mit Alkohol, dann zur Färbung mit den bekannten Anilinfarben in den gebräuchlichen Anwendungsweisen. Außerdem wendete er einmal die SCHMITZ'sche Pikrin-Hämatoxylinmethode und die Färbung mit anderen Hämatoxylinlösungen 10 an. Er hält nach seinen wiederholten Untersuchungen das Vorhandensein eines einzigen typischen Zellkerns in jeder Hefenart und in jeder Hefenzelle gegenüber den Einwänden von KRASSER aufrecht.

Ob MOELLER wirklich in allen Fällen den Zellkern vor sich gehabt hat, möchte angesichts seiner Angabe zweifelhaft erscheinen, daß der 15 Zellkern stets in Einzahl neben den reifen oder unreifen Sporen in dem immer noch durch Färbung erkennbaren wandständigen Plasma nachweisbar war. Auf der anderen Seite sind jedoch die Angaben sehr bestimmte und scheint MOELLER auch Teilungszustände des Kernes gesehen zu haben.

20 DANGEARD hat an dem mit Alkohol fixierten und mit Hämatoxylin gefärbten Untersuchungsmaterial (Bierhefe) die Erscheinungen, welche die Sprossung begleiten, verfolgt und Teilung des Zellkernes gesehen.

Die sehr sorgfältigen Studien von BUSCALIONI an dem *S. guttulatus* stützen sich auf in der Wärme fixierte und mit BÖHMER'schem Häma- 25 toxylin gefärbte Präparate. Er unterscheidet sehr deutlich zwischen Vakuolen und stark lichtbrechenden Körperchen, die sich manchmal ebenfalls mit Hämatoxylin färben, auch hat er Teilungsvorgänge bei der Sprossung und Sporenbildung beobachtet.

§ 11. Neuere Arbeiten über den Zellkern der Hefen.

30 Die im Jahre 1898 erschienene umfangreiche Arbeit von JANSSENS und LEBLANC (1) ergänzt die früher von JANSSENS (1) gemachten Angaben. Die beiden Autoren haben eine große Anzahl von Hefen in Reinkulturen untersucht. Die Zellen wurden von zwei zu zwei Stunden während der ganzen Dauer einer normalen Gärung fixiert und hierzu vorherrschend 35 die von MOELLER angegebene Methode mit geringen Abänderungen benutzt. Dieselbe hat tadellose Präparate ergeben. Alle gewöhnlichen Kernfärbemittel gaben mehr oder weniger gute Resultate: saures Methylgrün, Alaunkarmin, Hämatoxylin von DELAFIELD und schwarzes Hämatoxylin. Bei der Anwendung der Färbung nach HEIDENHAIN, wobei die 40 Präparate in einer 2,5-proz. Eisenalaunlösung gebeizt und dann mit einer 0,5-proz. Hämatoxylinlösung gefärbt werden, erhielten die Forscher die besten Resultate.

Beim Studium dieser Arbeit erhält man wiederholt den Eindruck, als ob JANSSENS und LEBLANC eine Vakuole mit stark lichtbrechendem 45 Körperchen für den Zellkern halten. Auch GUILLIERMOND spricht sich in dem gleichen Sinne aus. Allerdings sagt JANSSENS a. a. O. S. 13 bzw. 213 selbst: „Le lecteur aura deviné sans doute, qu'à l'état vivant le noyau se présente, à ce stade, sous la forme d'une vacuole avec un petit nucléole rond au centre." Im dritten Leitsatz heißt es ebenfalls: 50 „Il (le noyau) présente alors à frais l'aspect d'une vacuole renfermant

une sphérule animée de mouvements browniens." Auch neuerdings vertritt JANSSENS (2) wieder den Standpunkt, daß der Zellkern beim Beginn der Gärung eine Vakuole mit Nucleolus darstellt.

Einzelne der Abbildungen, in welchen Kernteilungsfiguren dargestellt sind, würden jedenfalls durch photographische Aufnahme der Präparate sehr an Wert gewonnen haben, wenn auch in diesem Falle noch hinsichtlich der Deutung der erhaltenen Bilder große Vorsicht am Platz gewesen wäre. In Beziehung auf das Verhalten des Kernkörperchens gegenüber den angewendeten Reagentien mag noch bemerkt sein, daß hier Erscheinungen wiederkehren, welche ich bei den „Oelkörperchen", die ja in vieler Beziehung mit den stark lichtbrechenden Körperchen in den Vakuolen übereinstimmen, beobachtet habe. Gerade dieses Verhalten des Kernkörperchens JANSSENS trägt aber mit dazu bei, daß zwischen dem Zellkern JANSSENS und Vakuolen eine große Aehnlichkeit besteht.

Die sehr genauen Untersuchungen von WAGER, welche er an einer größeren Anzahl von Hefen, darunter *S. Ludwigii* und *S. Pastorianus* angestellt hat, stützen sich auf Präparate, welche mit konzentrierter Sublimatlösung oder mit Jod in Jodkaliumlösung gehärtet waren. Zum Färben wurden verschiedene Lösungen in Anwendung gebracht: zu Doppelfärbungen eignete sich sehr gut Methylgrün mit Fuchsin oder Eosin; einfache Färbungen wurden mit Hämatoxylin, Safranin u. a. erzielt. WAGER hat die gefärbten Zellen auch mit dem Mikrotom geschnitten.

BOUIN, welcher *S. Pastorianus*, *S. cerevisiae*, *S. Ludwigii*, *S. tumefaciens* und *Mycoderma* untersuchte, erhielt die günstigsten Resultate mit Hämatoxylin-Alaunlösung und besonders mit Eisenalaun-Hämatoxylin nach Fixierung mit Alkohol oder Sublimat.

Zum Fixieren der Zellen erscheint MARPMANN die ROLL'sche Lösung am geeignetsten. Der Kern wird durch Hämatoxylinfarben, durch Fuchsin und Gentianaviolett gut gefärbt, während die Granula besser die Methylenblau- und Jodgrün-Farben aufnehmen. Auch MARPMANN bestätigte wieder, daß gute Färbungen HEIDENHAIN's Eisenlack-Hämatoxylin gibt.

In der sehr kritischen Arbeit von HOFFMEISTER wird besonders die Wichtigkeit der Fixiermittel betont und empfiehlt er 1. die VOM RATH'sche Lösung (s. Bd. I, S. 158), 2. Quecksilberchlorid, 3. MERKEL'sche Lösung (s. Bd. I, S. 158), 4. Jod-Jodkalium. HOFFMEISTER hat die von den verschiedenen Autoren empfohlenen Färbungsverfahren vergleichend ausprobiert. Schon im fixierten Material ist nicht selten der Zellkern als eine dunklere, dichtere, unscharf begrenzte Masse sichtbar.

HOFFMEISTER's Versuche ergaben, daß man durch verschiedene Anilinfarbstoffe, wie Fuchsin, Gentianaviolett u. a., in Hefenzellen ziemlich leicht einen sich intensiver färbenden Inhaltskörper von nicht scharfer Begrenzung nachweisen kann, welcher offenbar mit dem Zellkern der verschiedenen Autoren identisch ist. Methylenblau und Jodgrün färben diesen Inhaltskörper nicht intensiver, sondern werden ungemein stark von den Granulis gespeichert. Vorzügliche Dienste leisteten die Hämatoxylinlösungen: BÖHMER'sches Hämatoxylin und vor allen anderen die Hämatoxylin-Eisenlackfärbung nach HEIDENHAIN, die besonders sicher und leicht zum Ziel führt und sich bei allen geprüften Arten bewährte.

FEINBERG wendete wie ZIEMANN (1) und ZETTNOW (1) die Methylenblau-Eosinfärbung an. Bei richtiger Mischung der beiden Farbstoffe besitzt das Rot aus Methylenblau bei dieser Färbung eine Affinität zu

der Chromatinsubstanz. Der Kern der Hefenzellen geht mit diesem gleichfalls eine Verbindung ein und färbt sich rot, während das Plasma blau gefärbt erscheint.

Die sehr sorgfältigen und umfassenden vergleichenden Studien von GUILLIERMOND, welche er zum Schluß in einem Buche zusammenfaßte, bestätigten ebenfalls im wesentlichen die Angaben früherer Forscher. Eine gewisse Bedeutung gewinnen diese Studien dadurch, daß bei denselben ein Anschluß an Fadenpilze (*Dematium, Oidium lactis*) gesucht und gefunden wurde. Gute Resultate für die Differenzierung des Zellkerns gab die Fixierung mit einer konzentrierten wässerigen Lösung von Pikrinsäure und die Färbung mit Methylenblau und Hämatoxylin. Noch größere Erfolge wurden bei Anwendung von Pikroformol zur Fixierung erzielt. Der Kern differenzierte sich deutlich nur mit Hämatoxylin und zwar wieder bei Anwendung der Hämatoxylin-Eisenlackfärbung nach HEIDENHAIN. Die Schnittmethode hat niemals bessere Resultate als einfach gefärbte Präparate ergeben.

Die von einer lebhaften Phantasie zeugenden Mitteilungen von A. HIRSCHBRUCH, welche von vornherein wenig Vertrautheit mit der Hefenfrage beweisen, stützen sich auf Hefenpräparate, welche durch Erhitzen fixiert, mit Fuchsin gefärbt, dann mit einer Schwefelsäuremischung abgespült und eventuell mit wässeriger Methylenblaulösung nachgefärbt waren. Das luftige Gebäude der hermaphroditischen Befruchtung des Kernes und der Degenerationsvorgänge am Hefenkern bedarf jedenfalls noch einer kräftigeren Stütze als sie diesem durch HIRSCHBRUCH gegeben ist.

RAYMAN und KRUIS beizten die nach MOELLER fixierten Hefenzellen mit einer ammoniakalischen Eisenalaunlösung und färbten dann mit Alizarin PS von BAYER & CIE. in Elberfeld und entfärbten mit der gleichen Eisenalaunlösung. Sie erhielten auf diese Weise Präparate, in welchen der Zellkern tiefrot gefärbt, während das Cytoplasma ungefärbt war. Wenn man aus den Erfolgen bei Bakterien schließen darf, wird voraussichtlich das einfache Eintrocknenlassen der Objekte auf einem gut gereinigten Objektträger bei gewöhnlicher Temperatur und dann im Exsiccator noch günstigere Resultate als sie bisher erzielt wurden, erwarten lassen dürfen.

§ 12. Gestalt, Größe, Lage und Bau des Zellkerns.

Die Gestalt des Zellkerns wird von den verschiedenen Autoren verschieden beschrieben. Nach SCHMITZ besitzt er Kugelform, HANSEN dagegen fand den Zellkern, wenigstens in einigen Fällen, scheibenförmig. SCHMITZ bemerkt jedoch selbst an einer anderen Stelle, die sich allerdings nicht auf Hefenzellen bezieht, daß bei der gleichen Zelle der Kern in den verschiedenen Entwicklungsstadien derselben verschiedene Formen zeigen kann. In jüngeren Zellen ist er oft kugelförmig, während er in älteren Zellen scheibenförmig wird und regelmäßigen oder unregelmäßigen Umriß besitzt. Hierdurch mag wohl der Unterschied in dem Befund, wie ihn MOELLER und BOUIN darstellen, eine hinreichende Erklärung finden. Berücksichtigt muß jedoch auch werden, daß jedenfalls der zarte, plastische Zellkern durch die Fixierung, überhaupt durch die Präparation zur Sichtbarmachung, mannigfache Zerrungen und Veränderungen erleiden kann und daß sich damit, wenigstens teilweise, die Un-

regelmäßigkeit der Form ungezwungen erklären läßt. MOELLER und BOUIN sprechen die Vermutung aus, daß der Kern seine Lage unter amöboiden Formveränderungen wechseln könne; hierüber vermögen jedoch nur direkte Beobachtungen an der lebenden Zelle sicheren Aufschluß zu geben. Eine Veränderung der Lage überhaupt findet nach der Teilung 5 bei der Sprossung statt. Ich selbst habe in nach dem Verfahren von SCHMITZ angefertigten Präparaten den Kern in der Regel als ein im allgemeinen kugelförmiges Gebilde mit mehr oder weniger unregelmäßigen Umrissen gesehen. GUILLIERMOND führt die unregelmäßige Form des Zellkerns darauf zurück, daß er manchmal von metachromatischen Körperchen 10 umgeben ist. In Kugelform wurde er in der ruhenden Zelle außerdem von DANGEARD und FEINBERG beobachtet. MOELLER beschreibt den Kern als meist rundlichen, zuweilen auch abgeflachten, scheibenförmigen Körper, der bei älteren vegetativen Zellen an dem Rand buchtig gelappt erscheint. Nach den Beobachtungen von HOFFMEISTER entspricht seine 15 Gestalt einer einseitig ziemlich stark zusammengepreßten Kugel, er erscheint also in bestimmten Ansichten elliptisch, in anderen kreisförmig. Die Begrenzung ist scharf, die Oberfläche bei den mit VOM RATH'scher Lösung fixierten Präparaten glatt.

Wenn ZALEWSKI wirklich den Zellkern vor sich gehabt hätte, dann 20 würde die **Größe** desselben eine recht ansehnliche sein und der Durchmesser bis zu einem Drittel von demjenigen der Zelle selbst betragen. BUSCALIONI hat bei seinen an *S. guttulatus* angestellten Beobachtungen die Größe des Zellkerns in den einzelnen Zellen angeblich verschieden befunden, größer in den größeren Zellen und umgekehrt. 25 Auch nach MOELLER kann die Größe des Kernes innerhalb sehr weiter Grenzen schwanken. Andrerseits gibt jedoch GUILLIERMOND an, daß der Durchmesser fast konstant sei. Nach den Abbildungen von JANSSENS und LEBLANC, von HOFFMEISTER und von GUILLIERMOND scheint der Zellkern verhältnismäßig klein zu sein; letzterer gibt die Größe für *S. cerevisiae* 30 mit 1,7—2 μ an.

Im Reifezustand befindet sich in keiner Hefenzelle mehr als ein Kern. Eine bestimmte Lage scheint er nicht zu haben; er findet sich entweder in der Mitte oder wandständig und zwar seitlich oder nach MOELLER in der Regel an der Spitze bei eiförmigen Zellen in das 35 Plasma eingebettet. Bei einigen Hefen (bei *S. anomalus* nach GUILLIERMOND) scheint jedoch die Stellung des Zellkernes manchmal in Beziehung zu dem Ursprungsort der jungen Sproßzelle zu stehen; doch handelt es sich sehr wahrscheinlich nur um ein zufälliges Zusammentreffen.

Ueber den **Bau** des Zellkerns der Hefen hat wohl ZALEWSKI im 40 Jahre 1885 die erste Bemerkung gemacht; sie betrifft das Vorkommen des Kernkörperchens. Nach den oben gemachten Ausführungen liegt jedoch sehr wahrscheinlich auch nach dieser Richtung hin ein Irrtum vor. Eine völlige Uebereinstimmung über den Bau des Zellkernes besteht auch heute noch nicht. 45

DANGEARD, BOUIN, JANSSENS und LEBLANC stimmen darin überein, daß der Zellkern ähnlich wie bei den Fadenpilzen, welche GUILLIERMOND untersucht hat, von einer deutlichen Membran begrenzt wird sowie ein Nucleohyaloplasma und ein Kernkörperchen besitzt. GUILLIERMOND unterscheidet in Beziehung auf letzteres außerdem noch zwei Typen, indem 50 einmal ein einziges Kernkörperchen, ein Chromoplast (bei der Mehrzahl der Hefen und bei den Schizosaccharomyceten), in anderen Fällen einige das Kernkörperchen vertretende chromatische Elemente (*S. cerevisiae*,

S. Pastorianus, S. ellipsoideus) vorhanden sein können. Der Nucleolus ist kugelförmig. Nach den Beobachtungen von BOUIN befinden sich in dem von einer Membran umschlossenen Nucleoplasma chromatische Granula. JANSSENS und LEBLANC haben auch gefunden, daß bei den meisten der
5 HANSEN'schen *Saccharomyces*-Arten wie auch bei *Schizosaccharomyces Pombe* und bei verschiedenen Bier- und Preßhefen in dem Kernplasma unter gewissen Bedingungen Vakuolen auftreten, insbesondere dann, wenn gut ernährte und vakuolenfreie Kulturen in frische Würze übertragen werden. Solche Vakuolenbildung wurde dagegen in zwei Ausnahmefällen stets ver-
10 mißt, nämlich bei *Saccharomyces Ludwigii* und *Schizosaccharomyces octosporus*.

Im Gegensatz zu den Angaben von DANGEARD, BOUIN u. A. spricht sich HIRSCHBRUCH bestimmt dahin aus, daß der Zellkern der Hefe zwar einen Kernhof, jedoch keine Membran besitzt. HOFFMEISTER konnte in den meisten Fällen eine Struktur des Kernes nicht oder nur mit zweifel-
15 haftem Erfolg auffinden. In einzelnen Fällen war deutlich ein kleines dunkles Körperchen im Zellkern zu unterscheiden, welches als Nucleolus zu deuten wäre. FEINBERG schließt aus seinen Beobachtungen, daß der Kern der Hefenzelle im Ruhezustand aus einem „Kernpunkt" (Chromatinsubstanz) besteht, der manchmal eine lockere Beschaffenheit, jedoch
20 niemals Nucleolarsubstanz zeigt. Der „Kernpunkt" grenze im allgemeinen an das Cytoplasma an, und es sei eine scharf begrenzte Zone zwischen diesem und dem Kernpunkt nicht sichtbar.

Eine besondere Auffassung vertritt WAGER. Der Zellkern liegt oft nahe bei einer Vakuole, er kann jedoch auch von derselben deutlich
25 getrennt sein. WAGER betrachtet nun die Vakuole, welche ein körniges Chromatinnetzwerk und stark lichtbrechende Körperchen (Granula, Chromatinsubstanz) enthält, und den Kern junger Hefenzellen als ein zusammengehöriges Ganzes, als ein Organ, den eigentlichen Kern, als den Kernapparat. Der in engem Kontakt mit der Chromatinvakuole
30 stehende Körper entspräche dann dem Nucleolus. Der Nucleolus bietet in manchen Stadien einen ähnlichen Bau wie der Zellkern der höheren Pflanzen. In älteren Zellen kann die chromatinführende Vakuole verschwinden, ihren Platz nehmen dann ein körniges Netzwerk oder aber Chromatinkörperchen ein, die durch das Cytoplasma zerstreut oder rund
35 um den Nucleolus gelagert sein können. Es findet sich also hier wieder eine Anschauung, welche teilweise schon von JANSSENS ausgesprochen wurde, aber kaum haltbar sein wird.

Sehr wahrscheinlich entspricht der „Kernpunkt" FEINBERG's und der Nucleolus WAGER's den Körpern, welche MOELLER, BUSCALIONI,
40 BOUIN und GUILLIERMOND als Zellkern betrachten.

§ 13. Die Teilung des Zellkernes bei der Sprossung und Sporenbildung. Verschmelzung der Zellkerne. Sexualität.

Die bisher gemachten Angaben über die Gestalt und den Bau des Zellkerns der Hefe beziehen sich stets auf Zellen, welche nicht in Ver-
45 mehrung sind. Beginnt eine solche sich einzustellen, dann tritt auch an dem (bisher „ruhenden") Kerne eine entsprechende Aufteilung (d. i. Vermehrung) des Kernes ein. Für den Verlauf einer solchen Kernteilung liegen zwei Möglichkeiten (s. Bd. I, S. 159 u. 160) vor: entweder die verhältnismäßig einfach verlaufende sogenannte d i r e k t e Kern-
50 teilung, welche auch als Fragmentation oder Amitose bezeichnet wird,

oder aber die indirekte Teilung, auch als Segmentierung, Karyokinese oder Mitose bezeichnet. Bei dieser letzteren gehen bekanntlich die beiden Tochterkerne als das Ergebnis von tiefgreifenden Veränderungen und Umlagerungen des Kerngefüges hervor. Hinsichtlich der Hefenzellen herrscht noch keine Uebereinstimmung, jedoch ist aus den Beobachtungen der Mehrzahl der Autoren zu schließen, daß sich die Teilung des Zellkernes in der Regel auf direktem Wege oder, wie bei der Mehrzahl der niederen Pilze, durch einen Modus vollzieht, welcher zwischen der direkten und indirekten steht. Es ist sehr wahrscheinlich, daß mit fortschreitender Verbesserung der Präparationsverfahren auch ein besserer Einblick in die feineren Vorgänge, welche sich bei der Teilung vollziehen, gewonnen wird. Möglicherweise läßt das Verbindungsstück zwischen den beiden Tochterkernen (im Stadium der Hantelform) noch feinere Strukturverhältnisse erkennen.

Die mit der Sprossung verbundene Kernvermehrung war durch Moeller im Jahre 1892 für Fragmentation erklärt worden. Dangeard ist ein Jahr später dieser Auffassung beigetreten, im Jahre 1896 auch Buscalioni sowie im Jahre 1898 noch Wager. Hingegen hatte Janssens im Jahre 1893 behauptet, daß die Kerne in den sprossenden Hefenzellen sich auf dem Weg der Karyokinese vermehren. Noch im Jahre 1903 behauptet Hirschbruch in seiner oben angezogenen Arbeit, daß die Kernteilung bei *S. ellipsoideus* eine mitotische sei. Auch Hoffmeister möchte annehmen, daß es sich um einen karyokinetischen Teilungsprozeß handelt, dessen Typus jedoch von dem an höheren Pilzen zu beobachtenden vielleicht sogar wesentlich abweicht. Hoffmeister will es scheinen, als ob Janssens und Leblanc nicht viel mehr beobachtet haben als er selbst.

Ebenso widerstreiten einander die Angaben betreffend die Kernteilung bei der Entwicklung der Endosporen. Janssens erklärt sie für karyokinetisch; nach Buscalioni erinnert sie ebenfalls an Karyokinese. Diese Widersprüche schienen im Jahre 1898 durch die Beobachtungen von Janssens und Leblanc gelöst zu sein, daß sich bei *S. Ludwigii* und wahrscheinlich auch bei *Schizosaccharomyces octosporus* die Teilung mittelst eines Vorganges vollzieht, welcher zwischen der eigentlichen Kinese und der Fragmentation steht. Zur Zeit der Sprossung findet man bald eine Teilung durch Fragmentation, bald eine rudimentäre Kinese. Solche Uebergänge zwischen den beiden Grenzfällen einerseits der Mitose und andrerseits der Amitose sind in den letzten Jahren auch an den Zellen höherer Pflanzen festgestellt worden. Das Alter der Zelle und des Kernes, die Ernährungsbedingungen und selbst die Temperatur üben in dieser Richtung einen Einfluß aus. Alles, was die Lebensfähigkeit der Zelle beeinträchtigt, vereinfacht auch den Teilungsvorgang.

Bezüglich der übrigen Hefenformen schließen sich Janssens und Leblanc völlig der Anschauung von Moeller und Dangeard an, nach welcher die Teilung durch Einschnürung vor sich geht. Allerdings beobachtet man zuweilen Bilder, welche entfernt an die Teilungsvorgänge bei *S. Ludwigii* erinnern.

Marpmann hat bei Teilungsvorgängen öfter den Eindruck einer echten Karyokinese erhalten; ein Fadengerüst konnte allerdings nicht beobachtet werden.

Guilliermond stellt sich im allgemeinen auf den gleichen Standpunkt wie Janssens und Leblanc. Die beiden Teilungsvorgänge können

nach ihm in Uebereinstimmung mit den beiden letzten Autoren bei *S. Ludwigii* auftreten. Der zweite (rudimentäre Kinese) scheint häufiger bei gewissen Arten wie *S. anomalus, S. membranaefaciens, Mycoderma vini* und *M. cerevisiae* zu sein. Konstant findet er sich bei den Schizo- 5 saccharomyceten.

Bei der **Sprossung** geht der Ausstülpung der jungen Tochterzelle die Kernteilung voraus. Die Kernmembran verschwindet bei den gewöhnlichen Saccharomyceten nach JANSSENS und LEBLANC bei der Teilung niemals. Bei *S. Ludwigii* dagegen und bei allen Hefen, bei welchen sich 10 die Teilung nach dem gleichen Modus wie bei dieser Art vollzieht, beginnt die erste Phase mit dem Verschwinden derselben; sie löst sich im Cytoplasma auf. Hierauf streckt sich der Nucleolus in die Länge und teilt sich in zwei Teile. Die beiden Teil- 15 stücke bleiben zunächst durch eine viel dichtere Substanz als ursprünglich miteinander vereinigt. Die beiden Kern- 20 körperchen begeben sich hierauf in die Nähe derjenigen Stelle, an welcher sich die junge Tochterzelle hervorzu- 25 stülpen beginnt. In diesem Stadium sind bei *S. Ludwigii* häufig in der die beiden Nucleoli umgebenden Substanz An- 30 deutungen einer fädigen Struktur, einer Art von Spindelbildung, zu bemerken (*Fig. 40*). In der Mitte der Spindel 35 sieht man eine Querlinie, welche JANSSENS und LEBLANC als Zellplatte auffassen, aus welcher die Trennungswand zwischen Mutter- und Tochterzelle hervorgeht. In der Tochterzelle bildet sich um den Kern wieder eine Membran.

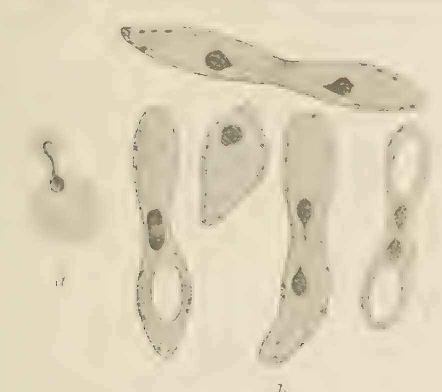
a b c d

Fig. 40. Kernteilung mit „Spindelbildung“ bei *Saccharomyces Ludwigii* HANSEN.
Zellen in verschiedenen Stadien der Kernteilung bei der Sprossung. Gefärbt. Der Nucleolus verlängert sich und teilt sich in zwei Teile, welche durch eine dichtere Substanz miteinander verbunden bleiben und sich an die Stelle begeben, an welcher die Sprossung stattfindet. In diesem Stadium ist an der Substanz, welche die beiden Nucleoli verbindet, zuweilen eine fädige Struktur, eine Art „Spindelbildung“ wahrnehmbar. Bei *a* erscheint inmitten der Spindel die Zellplatte, aus welcher die Trennungswand zwischen Mutter- und Tochterzelle hervorgeht (*c*). Reste der Spindel können sogar bestehen bleiben, wenn die Trennung von Mutter- und Tochterzelle bereits vollzogen ist (*d*). — Vergr. ca. 1200. Nach JANSSENS und LEBLANC.

Bei *S. Ludwigii* kann jedoch auch der andere Teilungsmodus auf- 40 treten. Der Kern verlängert sich in diesem Falle und erhält in der Mitte eine Einschnürung, an der sich die Teilung vollzieht *(Fig. 41, b)*.

Sehr oft wechselt der Zellkern bei der Teilung seinen Platz nicht; er befindet sich auf der der jungen Sproßzelle entgegengesetzten Seite. In diesem Falle verlängert er sich, wie dies GUILLIERMOND bei *S. cere-* 45 *visiae I* HANSEN beschreibt, und treibt einen sehr feinen Fortsatz, welcher die Zelle durchquert, um den jungen Sproß zu erreichen. Bei der Verbindungsstelle des letzteren mit der Mutterzelle angekommen, schwillt der Fortsatz an seinem Ende an und zeigt dann der Zellkern Hantelform. Die so entstandenen Anschwellungen bleiben einige Zeit durch 50 den Verbindungsfaden (das Mittelstück) miteinander verbunden. Später wird derselbe immer dünner und reißt auseinander, der für die Tochterzelle bestimmte Kern verlängert sich dann und tritt in den jungen Sproß über, wo er wieder seine normale Form annimmt.

Liegt dagegen der Zellkern nahe dem Sproß, so verlängert er sich einfach und tritt in denselben über: die Teilung erfolgt am Ursprung des Verbindungskanales zwischen der Mutter- und Tochterzelle (s. *Fig. 41, a.*)



b

Fig. 41. Kernteilung durch Einschnürung. *a Saccharomyces cerevisiae I* HANSEN. Gefärbt mit Hämatoxylin nach HEIDENHAIN. Zellkern von ziemlicher Größe (1,7—2 μ), kugelförmig mit Nucleohyaloplasma und Kernhaut. Der nahe an der Ausstülpungsstelle der Tochterzelle gelegene Zellkern verlängert sich und tritt in die Tochterzelle ein, indem er dabei „Hantelform" annimmt. Die Teilung erfolgt am Ursprung des Halses, welcher den jungen Sproß mit der Mutterzelle verbindet. — Vergr. ca. 1200. Nach GUILLIERMOND.

b S. Ludwigii HANSEN. Fixiert mit VOM RATH'scher Lösung. Gefärbt mit Eisenhämatoxylin. Sobald an einer Stelle der Mutterzelle ein kleines Knöpfchen sich gebildet hat, bewegt sich der Zellkern nach dem der Sprossung benachbarten Teile der Zelle hin. Er zerfällt in zwei Kerne, von denen einer in die junge Tochterzelle einwandert. Er streckt sich zunächst etwas in die Länge und es erfolgt eine Trennung in der Aequatorialzone, wobei öfters ein dünnes tingiertes Bändchen beide Kerne noch längere Zeit miteinander verbindet. Der eine Tochterkern tritt in die neue Sproßzelle über. — Vergr. 1500. Nach HOFFMEISTER.

Zuweilen verlängert sich der Kern auch nicht, um die Sproßzelle zu erreichen, sondern er teilt sich auf der Stelle, auf welcher er eben liegt. Er zieht sich ganz leicht auseinander, schnürt sich etwas in der Mitte ein und teilt sich dann durch eine Scheidewand. Die Zelle erscheint dann zweikernig. Das eine Teilstück wandert in die Tochterzelle.

Bei der **Sporenbildung,** welche hauptsächlich JANSSENS und LEBLANC (1), WAGER (1), HOFFMEISTER und GUILLIERMOND (4) studiert haben, folgt auf die erste Teilung bald eine zweite. Die Teilung des Kernes ist hierbei sehr schwer zu verfolgen, weil die neuen Kerne sehr nahe beieinander liegen bleiben. Eine ziemlich genaue Vorstellung erhält man, wenn sich die erste Teilung wie bei *S. Ludwigii* von Pol zu Pol der Zelle vollzieht.

Der Sporenbildung gehen, darin stimmen alle Autoren überein, Veränderungen des Cytoplasmas voraus; es treten zunächst zahlreiche Vakuolen auf. Nach der Beobachtung von WAGER soll vor der Vakuolisierung eine häufige Teilung der Kernvakuole stattfinden, wodurch das ganze Plasma mit Chromatin durchsetzt wird. Das Plasma zeigt eine wabenartige Struktur. Die Granula (s. § 15) — die metachromatischen Körperchen GUILLIERMOND's, die Chromatinsubstanz WAGER's — sammeln sich dann gewöhnlich in der Mitte der Zelle; sie stehen in innigem Zusammenhang mit dem Zellkern. Mit Osmiumsäure bräunen sie sich, wie schon BUSCALIONI (1) angegeben hat, sind also fettartiger Natur. Einige Zeit vor der Kernteilung scheinen sie aufgelöst zu werden; sie nehmen an Zahl und Umfang ab, und der Inhalt der Vakuolen nimmt nach den Beobachtungen von GUILLIERMOND mit allen Färbemitteln, welche den metachromatischen Körperchen ihre besondere Färbung geben, eine gleichmäßig rote Farbe an. Offenbar findet also vor der Aufteilung des Plasmas in die Sporen eine gleichmäßigere Verteilung und Vermischung der geformten Einlagerungen statt.

Der Kern teilt sich bei *S. Ludwigii* — wir folgen hier den Aus-

führungen von GUILLIERMOND — in zwei mehr oder weniger regelmäßige Teile *(Fig. 42)*, welche immer von einer Plasmascheide umgeben sind. Das ganze Cytoplasma teilt sich sodann in zwei Teile, welche sich nach den entgegengesetzten Enden der Zelle zurückziehen und je einen Zellkern einschließen. Die Teilstücke des Plasmas sind oft, wie dies auch JANSSENS und LEBLANC bei anderen Hefen beobachtet haben, durch ein sehr feines Plasmanetz miteinander verbunden, welches zuweilen die Form einer Spindel zeigt. Die zweite Teilung des Kernes findet an den beiden Enden der Zelle statt. Während nach den Angaben von JANSSENS und LEBLANC die erste Teilung noch durch eine mehr oder weniger ausgesprochene Kinese erfolgt, ist die zweite noch mehr reduziert. Die zweite Teilung findet senkrecht zur ersten statt. Die Kerne der zweiten Teilung bleiben sehr nahe beieinander liegen.



Fig. 42. Kernteilung bei der Sporenbildung. *Saccharomyces Ludwigii* HANSEN. Gefärbt mit Hämatoxylin nach HEIDENHAIN. Erste *a* und zweite *b*) Teilung des Kerns. Sporenanlagen mit calottenförmigem Aussehen nach der zweiten Teilung. — Vergr. ca. 1200. Nach GUILLIERMOND.

Die Sporen grenzen sich alsbald durch eine Art Plasmahaut ab, die vom Kern ausgeht und an der dem Kern entgegengesetzten Seite offen bleibt. Die Sporenanlagen erhalten hierdurch das Aussehen einer Calotte. Die Spore umgibt sich dann mit einer glänzenden Zone, welche der Anfang der Membranbildung zu sein scheint. Die Entstehung der Sporenhaut haben JANSSENS und LEBLANC verfolgt. Sie bildet sich frei im Plasma durch Ablagerung einer dichteren Substanz und erscheint dann als eine stärker lichtbrechende Zone, welche das dichte Plasma der Spore umgibt.

Bei *Schizosaccharomyces octosporus* scheinen nach den Angaben von GUILLIERMOND die Sporen nicht in der gleichen Weise wie bei den anderen Hefen zu entstehen. Die Kerne umgeben sich einfach mit einer dichten Plasmazone, welche sich abrundet und unmittelbar abgrenzt.

Die Sporen sind anfangs sehr klein; sie entwickeln sich allmählich auf Kosten des nach der Anlage der Sporen noch übrig bleibenden Plasmas, des sogenannten Epiplasmas. Das wandständige Protoplasma der Mutterzelle bleibt zunächst erhalten, das übrige Epiplasma löst sich auf: die Vakuolen verschmelzen, das Plasmanetz wird resorbiert. Schließlich ist es in einen Zellsaft umgewandelt, welcher das Glycogen und die Granula enthält, welche sich nicht aufgelöst haben. Das Epiplasma wird fast vollständig von den Sporen aufgenommen. Wenn die Sporen schon weit in der Entwicklung vorangeschritten, ja selbst wenn sie schon völlig ausgereift sind, läßt sich jedoch in dem die Sporenmutterzelle erfüllenden Safte öfters noch Glycogen nachweisen.

Die Sporenanlagen von unter- und obergäriger Bierhefe sind nach meinen eigenen Beobachtungen anfangs meist von einer großen Anzahl von Granula umgeben, welche sich mit Osmiumsäure intensiv schwarzbraun färben. Selbst an der Peripherie der jungen Sporen sind noch Granula in großer Zahl abgelagert. Im optischen Querschnitt erscheinen die Sporen wie von einer Perlenkette, welche auf größere oder kleinere

Strecken unterbrochen ist, umsäumt. Auch in dem von den Sporen anfangs freigelassenem Raume der Mutterzelle sind solche Granula teils einzeln teils in dichten Haufen, welche zuweilen Glycogenreaktion geben, vorhanden. Beim Aufquellen der reifen Sporen werden die nicht aufgelösten Granula zwischen den Wandungen der Sporen und zwischen diesen und der Mutterzellmembran eingeschlossen. Sie sind eine der Ursachen, daß diese Berührungsstellen der Wandungen ein auffallend starkes Lichtbrechungsvermögen besitzen. Auf den Berührungsflächen der Sporenhaut sind stark lichtbrechende Knötchen sichtbar.

Die Sporenbildung der Hefen zeigt also eine gewisse Analogie mit derjenigen der höheren Ascomyceten sowohl in Beziehung auf die bei der Sporenbildung selbst auftretenden Erscheinungen als auch hinsichtlich der Beschaffenheit des Epiplasmas.

Die reifen Sporen bestehen aus einem an der Sporenhaut liegenden Kern, von welchem eine Anzahl feiner Plasmastrahlen ausgehen. Diese begrenzen ebensoviele Vakuolen. Der Unterschied in dem Lichtbrechungsvermögen des Plasmas und des Vakuoleninhaltes ist oft so gering, daß letztere erst durch Färbungen sichtbar werden. Das Plasma enthält eine geringe Anzahl von metachromatischen Körperchen oder Granula, welche sich mit Osmiumsäure schwarzbraun färben. Den Sporen, welche Granula enthalten, fehlt Glycogen, dagegen geben die Sporen sowohl von Kultur- wie wilder Hefe, welche noch frei von Granula sind, und deren Inhalt gleichmäßig erscheint, öfter an einzelnen eng begrenzten Stellen schwache Glycogenreaktion.

Schon Beijerinck (1), welcher die Sporenbildung und die derselben vorausgehende Kernteilung bei *Schizosaccharomyces octosporus* verfolgte, hatte in den Sporen dieser Hefe den Kern und die um denselben strahlenförmige Anordnung des Plasmas beobachtet. Ebenso gelang es Hoffmeister, bei der Sporenbildung eine Kernteilung nachzuweisen, und stimmen seine diesbezüglichen Beobachtungen vollständig mit denjenigen von Wager überein, welcher ebenfalls in den Sporen eine vom Kern ausgehende strahlenförmige Anordnung des Plasmas gesehen hat.

Der Zweiteilung des Kernes entsprechend müßte die Zahl der Sporen eine gerade sein; dies trifft jedoch nicht immer zu. Abgesehen davon, daß zuweilen nur eine Spore in einer Zelle vorhanden ist, finden sich die Sporen häufig in der Dreizahl. Entweder hat in diesem Falle um einen der Kerne überhaupt keine Sporenanlage stattgefunden oder die Spore ist nicht zur Reifung gelangt, sie ist, wie nicht selten zu beobachten, verkümmert und wird von den stark aufgequollenen, ausgereiften Sporen vollständig verdeckt. Außerdem liegt noch die Möglichkeit vor, daß einer der Kerne nach der Teilung in einen jungen Sproß der Sporenmutterzelle ausgewandert ist.

Die Keimung der Sporen bietet hinsichtlich des Kernes nichts Besonderes. Die Teilung erfolgt in der gewöhnlichen Weise. Bei der Fusion der Sporen von *Saccharomyces Ludwigii* verschmelzen auch die Kerne; der einzige Kern tritt dann in das Promycel ein und teilt sich wie bei der Sprossung.

Schiönning (1) machte schon im Jahre 1895 die Beobachtung (s. S. 33), daß bei einer von ihm auf Rosinen gefundenen *Schizosaccharomyces*-Art, die mit *Schizos. octosporus* wahrscheinlich identisch ist, und bei letzterer selbst Sporenbildung in Zellen auftritt, welche durch Verschmelzung zweier Tochterzellen einer Mutterzelle entstanden sind. Er konnte jedoch nicht entscheiden, ob es sich um eine Verschmelzung von dem-

selben Wert wie bei den bei *S. Ludwigii* von HANSEN beobachteten Fusionsbildungen (Verschmelzung der Sporen und deren Keimschläuche) handelt, oder ob ein Sexualakt vorliegt. Die Angaben von SCHIÖNNING sind hauptsächlich von HOFFMEISTER (1), GUILLIERMOND (4) und BARKER (1, 2)
5 bestätigt und ergänzt worden. Durch letzteren wurde auch festgestellt, daß eine Verschmelzung selbst bei den Sproßhefen stattfinden kann. Er schlägt für die von ihm beobachtete Hefe den Namen *Zygosaccharomyces* (s. S. 34) vor. Obgleich BARKER hinsichtlich des Verhaltens der Kerne bei der Kopulation der Zellen nicht genügend sichere Anhaltspunkte
10 gewonnen hatte, hält er gleichwohl die Erscheinungen für sexuelle.

GUILLIERMOND (3) hatte schon früher die Vorgänge bei der Ascusbildung bei *Schizosacch. octosporus* und die Rolle, welche der Zellkern hierbei spielt, eingehend verfolgt. Die Kerne der verschmelzenden oder kopulierenden Zellen können sich nach dem Auflösen der sie trennenden Querwand zu
15 einem einzigen Kern vereinigen, um sich dann wiederholt zu teilen. Auch bei *Schizosacch. Pombe* wurden analoge Erscheinungen beobachtet. JANSSENS und LEBLANC glauben ebenfalls für die Hefe vor der Sporenbildung eine Vereinigung von zwei Zellkernen annehmen zu sollen. Bei den Hefenzellen, welche sich zur Sporenbildung vorbereiten, tritt zuerst
20 eine charakteristische Kernteilung auf, während welcher die ganze Kernmasse sichtlich auf das Doppelte anwächst. Die Teilung geht wahrscheinlich bis zur Bildung von zwei selbständigen Kernen. Die Selbständigkeit ist jedoch nur von kurzer Dauer und verschmelzen die beiden Teilkerne bald wieder. Die Kernkörperchen lösen sich auf, um schließ-
25 lich einen Kern zu bilden, der viel größer und dichter als gewöhnlich ist. WAGER und GUILLIERMOND haben niemals eine der Teilung vorhergehende Kernverschmelzung, wie sie von JANSSENS und LEBLANC angegeben wurde, beobachtet. GUILLIERMOND (5) führt diese Angabe der beiden letzten Autoren darauf zurück, daß sie zwei mit metachromatischen
30 Körperchen angefüllte Vakuolen als Zellkerne angesehen haben.

Es findet also sicher in einzelnen Fällen vor der Teilung des Zellkerns eine Kopulation und zwar eine isogamische statt. Meist sind es Geschwisterzellen, welche kopulieren. In den meisten Fällen erfolgt aber die Sporenbildung ohne vorausgegangene Kopulation und kann
35 letztere auch da fehlen, wo sonst die Sporen in der Regel ein Produkt der Kopulation sind.

Neuerdings vertritt wieder HIRSCHBRUCH (1) in einer Mitteilung, die noch sehr der Nachprüfung bedarf, die Anschauung, daß der Teilung des Zellkerns bei *S. ellipsoideus* eine Befruchtung desselben vorausgeht, und
40 daß jede Zelle beiderlei Geschlechter in sich vereint. Die Befruchtung der Geschlechtselemente soll in ein und derselben Zelle vor sich gehen; es würde sich also nicht nur um einen Bisexualismus jeder Zelle, sondern um eine hermaphroditische Selbstbefruchtung handeln. Die Befruchtung des Kernes soll hier durch ein bestimmtes, geformtes Element der Zelle
45 erfolgen. Der befruchtete Kern teilt sich in zwei Kerne.

Jedenfalls ist durch diese Untersuchungen die Frage der Sexualität der Hefen in Fluß gekommen, durch welche die Stellung der Hefen zu den Ascomyceten noch besser als bisher begründet würde.

§ 14. Die Vakuolen.

In sehr jugendlichen Hefenzellen ist der Inhalt feinschaumig und homogen. Wenn dieselben etwa bis zu ein Drittel oder der Hälfte der Größe der Mutterzellen herangewachsen sind, machen sich in dem Zellinhalt Differenzierungen in der Weise geltend, daß neben kleinen, stark lichtbrechenden Körperchen, welche im Cytoplasma zerstreut liegen, lichtere Stellen in wechselnder Zahl und Größe sichtbar werden. Meist sind die jüngsten Glieder eines aus einer Mutterzelle hervorgegangenen Sproßverbandes von sehr vielen derartigen lichteren Partien durchsetzt. In den älteren Zellen nimmt ihre Zahl ab und ihre Größe zu; sie heben sich damit schärfer von dem sie umgebenden Cytoplasma ab. In den ruhenden, während der Hauptgärung abgesetzten Zellen erscheinen sie als helle, kreisförmige, zuweilen auch bohnenförmige oder in ihren Umrissen unregelmäßig gestaltete, aber immer durch eine helle Linie begrenzte Räume von sehr verschiedener Größe. Sie sind entweder in der Einzahl oder in der Mehrzahl, und dann in mannigfachster Weise gruppiert, vorhanden und liegen entweder in der Mitte der Zelle oder sie sind der Zellwand mehr oder weniger genähert. Bei *Mycoderma* und den *Anomalus*-Arten ist ihre Zahl in den ruhenden Zellen meist auf zwei beschränkt und liegen sie entweder an den Enden der gestreckten Zellen oder erfüllen nahezu ganz das Zellinnere. Diese hellen Partien des Zelleninhaltes unterscheiden sich von dem sie umgebenden Cytoplasma wesentlich durch ihr Lichtbrechungsvermögen, sie sind blaß, ihr Lichtbrechungsvermögen ist ein geringes, während das dichtere, in den ruhenden Zellen meist mit Glycogen durchsetzte Cytoplasma ein starkes Lichtbrechungsvermögen besitzt.

Die beschriebenen lichteren, durch eine helle Linie scharf begrenzten Räume des Zellinhaltes werden als Vakuolen oder auch als Safträume bezeichnet. Sie sind von einer wässerigen Flüssigkeit erfüllt, über deren Zusammensetzung nichts bekannt ist. Wahrscheinlich besitzt sie saure Reaktion. Nach den Angaben von Hieronymus (1) färben sie sich bei der Behandlung lebender Zellen mit Loeffler's Methylenblau rot, während das Plasma blau gefärbt wird, woraus auf eine verschiedene Reaktion beider zu schließen ist. Bei Gegenwart gewisser Magnesiumverbindungen in künstlichen Nährlösungen färbt sich der Vakuoleninhalt, wie R. Schander (1) beobachtet hat, rosarot.

Das Zellplasma grenzt sich ebenso wie gegen die Zellhaut auch gegen die Vakuolen durch eine immer dichter werdende Schichte, welche als Vakuolenhaut (vgl. *Fig. 47* auf S. 69) bezeichnet wird, ab. Es ist dies die helle Linie, welche man in der Umgebung der Vakuolen beobachtet.

Die großen Vakuolen zeigen häufig eine unregelmäßige Umgrenzung und sind scheinbar von dichteren Strängen durchzogen. In diesem Falle ist die Verschmelzung mehrerer Vakuolen zu einer einzigen eingeleitet, wobei zunächst der feinschaumige Teil des Cytoplasmas zurücktritt, wodurch sich die Vakuolenhäute mehr und mehr einander nähern und dann die Stränge darstellen, welche scheinbar eine größere Vakuole durchziehen.

Bei der vegetativen Vermehrung nimmt in den Mutterzellen in demselben Maße, als die angehäuften Reservestoffe verbraucht werden, die Zahl und Größe der Vakuolen zu. Auch in den ruhenden Zellen ist dies der Fall, wenn sie sich in alten Kulturen bei mangelnder Zufuhr von frischer Nahrung allmählich erschöpfen. Die Vakuolen nehmen

an Größe zu, und oft erfüllt eine einzige bis auf einen dünnen, wandständigen Plasmabelag das Zellinnere. Sind mehrere vorhanden, so erscheint die Zelle durch die sie trennenden Vakuolenhäute wie von Querwänden durchzogen.

Obergärige Hefen sind meist reicher vakuolisiert als untergärige.

Bei regelmäßiger Form und Lagerung der Vakuolen, sowie gleichmäßiger Größe werden dieselben von Anfängern häufig mit Sporen verwechselt. Da jedoch die Sporen durch Teilung des verdichteten Plasmas entstehen, muß deren Lichtbrechungsvermögen größer sein, als dasjenige ihrer Umgebung. Im Gegensatz hierzu ist jedoch das Lichtbrechungsvermögen der Vakuolen geringer als dasjenige des Cytoplasmas, welches sie umgibt.

Wager (1) und Guilliermond (4) unterscheiden zwei Arten von Vakuolen. Neben der einen, eben beschriebenen, unter welcher Wager wieder Kernvakuolen unterscheidet, soll noch eine zweite Art, in welchen das Glycogen aufgespeichert ist, vorhanden sein. Offenbar liegt hier ein Irrtum vor. Würden tatsächlich mit Glycogen erfüllte Vakuolen vorhanden sein, so müßte doch deren Umgrenzung ebenso wie diejenige der anderen Vakuolen sichtbar sein. Außerdem müßten diese Vakuolen in die Erscheinung treten, wenn man die Zellen unter Bedingungen bringt, unter welchen das Glycogen rasch veratmet wird. Dies ist aber nicht der Fall. Allerdings gewinnt man, wie dies *Fig. 43* zeigt, bei der Einwirkung von wasserentziehenden Agentien auf Zellen, welche mit Glycogen angefüllt sind, den Eindruck, als ob die geschrumpfte Glycogenmasse in einer Vakuole läge. Die Erscheinung dürfte aber in der Regel wohl einfach in der Weise zu erklären sein, daß das stark aufgequollene, sehr wasserhaltige Glycogen bei der Schrumpfung die Plasmapartien, welche es durchsetzt, von dem umgebenden Plasma losreißt und in sich einschließt. Die ursprünglich vorhandenen Vakuolen werden beid em Absterben der Zelle durch das aufgequollene Glycogen zusammengedrückt.

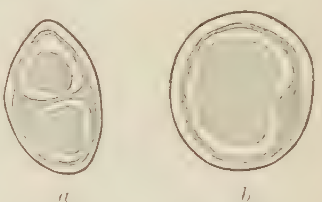


Fig. 43. Tote mit Glycogen erfüllte Zellen. Untergärige Bierhefe. Bodensatz einer Würzekultur. Durch das aufgequollene Glycogen ist die Vakuole zusammengedrückt und beiseite geschoben. Bei der Behandlung der Zellen mit Alkohol ist das Glycogen stärker geschrumpft als das Plasma und scheint nun innerhalb Vakuolen zu liegen. Ursprünglich lag eine Vakuole in dem dickeren Teil des geschrumpften Plasmas. — Vergr. ca. 2000. Nach Will.

Zuweilen dringen in sehr glycogenreichen Zellen, wie Guilliermond beobachtet hat, kleine Mengen von Glycogen in die Vakuolen ein. Ich kann diese Beobachtung bestätigen, bin jedoch in sehr vielen Fällen zu der Anschauung gelangt, daß dies kein normaler Vorgang ist und daß ein Erguß des Glycogens in die Vakuolen erst bei Einwirkung von Reagentien, wie von Jod-Jodkaliumlösung und anderen, erfolgt. Jedenfalls harrt diese Frage noch der Klärung. Außerdem mögen bei der Verschmelzung der Vakuolen einzelne zwischen denselben im Plasma liegende Inhaltsbestandteile (Glycogen und stark lichtbrechende Körperchen) in das Innere der Vakuolen gelangen.

Einschlüsse sind überhaupt in den Vakuolen nicht selten; sie befinden sich meist in sehr lebhafter Bewegung (Brown'sche Molekularbewegung). In Zellen, welche sich in vorwiegend mineralischen Nährlösungen entwickelten, werden sie häufiger angetroffen als in solchen,

welche in Bierwürze und ähnlichen Nährmedien gewachsen sind. Seltener finden sich in den Vakuolen kristallähnliche Gebilde (Kristalloide) von Würfel-, Tafel- und Nadelform, wie sie die *Fig. 44* und *Fig. 45* zeigen. Derartige Einschlüsse wurden in den Vakuolen von Saccharomyceten von RAUM (1), HIERONYMUS (1) und WILL (2), von letzterem insbesondere in sehr alten Würzekulturen, beobachtet. WILL hat Kristalloide sehr häufig in den Vakuolen von verschiedenen *Torula*- und nicht selten in denjenigen von *Mycoderma*-Arten sowie von *Monilia* gefunden. Ueber die Natur der Kristalloide ist bis jetzt kaum etwas bekannt. Bei einigen von WILL beobachteten *Torula*-Arten und bei *Monilia* zeigten sie die Erscheinung der Doppelbrechung; sie leuchteten bei gekreuzten Nicols hell auf.

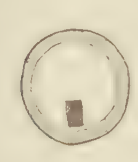


Fig. 44. Kristalloid, tafelförmig, in der sehr großen Vakuole einer Zelle aus dem Hefenring einer 7 Monate alten Kultur von untergäriger Bierhefe in Würze. — Vergr. ca. 1500. Nach WILL.

Die in den Vakuolen eingeschlossenen stark lichtbrechenden Körperchen werden im § 17 besprochen.

In sehr großen Vakuolen lebender Zellen von Saccharomyceten beobachtet man zuweilen fein granulierte blasse Stränge, welche in wechselnder Breite und Verästelung quer durch die Vakuolen ausgespannt sind. Aehnliche Inhaltsbestandteile gibt WAGER (1) für die Chromatinvakuole (s. S. 58) an.



Fig. 45. Kristalloid, nadelförmig, in der Vakuole einer *Torula*-Art. Zuweilen gewinnt man den Eindruck, als ob nicht einzelne Kristalloide sondern Büschel von solchen vorhanden wären. In der Tochterzelle ein Granulum. — Vergr. ca. 3000. Nach WILL.

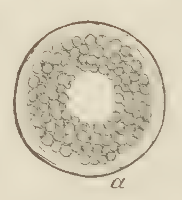
Die Vakuolen von *Mycoderma* enthalten nach den Beobachtungen von WILL (7) anscheinend kugelförmige, die ganze Vakuole ausfüllende Gebilde, deren Lichtbrechungsvermögen mit demjenigen des Cytoplasmas übereinstimmt und infolgedessen auch anfangs die Vakuolen nicht deutlich hervortreten läßt. Die Natur dieser Einschlüsse konnte bis jetzt noch nicht festgestellt werden. Bei gewissen *Torula*-Arten, in deren Vakuolen sich ähnliche Einschlüsse befinden, färben sich dieselben mit Jod schwach rotbraun.

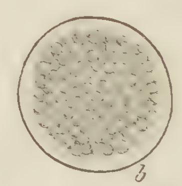
§ 15. Allgemeines über die Granula. Vorkommen. Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren. Größe, Gestalt und Verteilung.

Neben den Vakuolen weisen die Zellen der echten Hefen sowie der meisten übrigen Sproßpilze Einschlüsse auf, welche wie jene ohne weiteres sichtbar sind. Im Gegensatz zu den Vakuolen zeichnen sie sich durch ein starkes Lichtbrechungsvermögen aus und drängen sich durch dieses dem Auge des Beobachters geradezu auf. Da ihr Aussehen demjenigen von Fett- oder Oeltröpfchen gleicht, wie sie in den Zellen höherer Pflanzen sich finden, so hat man diese „stark lichtbrechenden Körperchen" früher auch kurzweg als „Fett- oder Oeltröpfchen" bezeichnet. Später nannte man sie gewöhnlich „Granula" und wird diese Bezeichnung auch jetzt noch meist beibehalten, obgleich nach den vorliegenden Untersuchungen über den Bau und die Zusammensetzung der stark lichtbrechenden Körperchen die Bezeichnung Oel-

körperchen jedenfalls die Natur derselben in den meisten Fällen treffender charakterisiert. Zu berücksichtigen ist jedoch, daß jedenfalls die Granula nicht immer einheitlicher Natur sind und daß insbesondere bei absterbenden und in Auflösung begriffenen Zellen ein Teil der 5 Granula tatsächlich nur Fett- oder Oeltröpfchen darstellen. Offenbar sind nicht zu allen Zeiten verschiedene Arten von stark lichtbrechenden Körperchen auseinandergehalten worden, und es werden damit sowie durch die Unkenntnis eines besonderen Baues einer Gruppe derselben die mannigfachen Widersprüche in den Literaturangaben begreiflich. Manch-10 mal werden die Granula auch als **Mikrosomata** bezeichnet. Nach ihrem Verhalten gegenüber verschiedenen Farbstoffen, durch welche sie intensiv rot gefärbt werden, stellt sie GUILLIERMOND (1, 4) auf die gleiche Stufe mit den metachromatischen Körperchen von BABES und mit den roten Körnchen von BÜTSCHLI und bezeichnet sie auch als solche. 15 Allerdings hat er in erster Linie die in den Vakuolen befindlichen, lebhaft sich bewegenden Granula im Auge, die aber jedenfalls auch keinen einheitlichen Typus repräsentieren. Die „Chromatinkörner" von ZETTNOW (1), welche er in Hefenzellen mittels der ROMANOWSKI'schen Doppelfärbung (Methylenblau und Eosin) differenziert hat, wobei die Körner 20 im Gegensatz zu dem blau gefärbten Plasma rot gefärbt erscheinen, gehören jedenfalls auch in die Kategorie der Inhaltsbestandteile, welche wir hier im Auge haben.

Man vermißt die Granula in sehr jungen Zellen. Sie treten jedoch schon verhältnismäßig frühzeitig auf, bevor bei den Hefenzellen in dem Cytoplasma 25 mit Jod eine rotbraune Färbung (die Reaktion auf Glycogen) sei es an einzelnen, engumgrenzten Stellen oder in größerer Ausdehnung auftritt. Die junge Tochterzelle, welche etwa ein Drittel oder die Hälfte der Größe der Mutterzelle erreicht hat, ist schon von vielen stark lichtbrechenden Körperchen durchsetzt. In den weiter heranwachsenden und allmählich in den Ruhe-30 zustand übergehenden, sowie in den je nach den Ernährungsbedingungen sich mehr oder minder mit Glycogen erfüllenden Zellen treten sie jedoch wieder zurück. Sie finden sich meist nur noch in geringer Anzahl in der Umgebung der großen Vakuolen vor. 35 Wird solche Hefe sich selbst überlassen, und verschwindet während der Selbstgärung das Glycogen, so treten 40 die Granula wieder in reichlicher Menge auf. Auch RAUM (1) hat beobachtet, daß das vollständige Aus-45 bleiben der Jodreaktion nicht selten mit der Anwesenheit von größeren oder kleineren Anhäufungen von Granula zusammenfiel. Die Dauerzellen sind, wie *Fig. 46* zeigt, meist besonders reich an Oelkörperchen, ebenso wie auch die Zellen der Hautgenerationen auf Nährflüssigkeiten und diejenigen der Rindenschicht der Riesenkolonien. Zweifellos ist 50 auch die Art der Ernährung von Einfluß auf das Auftreten der Granula, und es ist bekannt, daß die in Nährsalzlösungen herangewachsenen Hefen meist reich an großen Oelkörperchen sind. HIERONYMUS (1) fand in den Zellen von Preßhefe, welche sich in einer mit





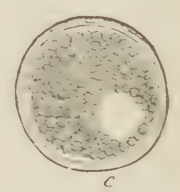


Fig. 46. Dauerzellen von untergäriger Bierhefe; entweder ganz oder zum Teil mit Oelkörperchen erfüllt. Zellwand stark verdickt. — Vergr. ca. 2000. Nach WILL.

Traubenzucker versetzten Nährsalzlösung entwickelt hatten, wenig Granula, hingegen deren viele in solchen Zellen, welche er in Milch oder in Rübenzuckerlösung gehalten hatte. Bei Abwesenheit von Zucker oder bei Gegenwart von Glycerin im Nährboden unterbleibt zufolge der Angaben von RAUM, welcher zuerst diese Einschlüsse eingehender untersucht hat, die Bildung der Granula. 5

GUILLIERMOND (4) hat eine große Reihe von Versuchen durchgeführt, welche die Abhängigkeit der Granula von der Zusammensetzung der Nährlösung dartun sollten, ohne jedoch zu einem abschließenden Urteil gelangen zu können. 10

Auch die Zeit und die Temperatur sind von Einfluß, und man findet in alten Kulturen in flüssigen und auf festen Nährböden die größte Mannigfaltigkeit hinsichtlich Zahl, Lagerung und Größe der Granula. Bei sehr niedrigen Temperaturen ist nach meinen eigenen Beobachtungen selbst in günstig für die Ernährung der Zelle zusammengesetzten Lösungen 15 die Zahl der Granula meist größer als bei höheren Temperaturen.

Während bei den meisten Saccharomyceten und bei den Schizosaccharomyceten die Granula in der Regel in größerer Zahl auftreten, beschränken sie sich bei den zu den Gruppen *S. anomalus*, *Torula*, *Mycoderma*, sowie zu verwandten Sproßpilzen gehörigen Arten und Varie- 20 täten auf eine geringe Zahl: meist finden sie sich in der Dreizahl, bei den *Torula*-Arten sogar nur in der Einzahl vor.

Mit dem Eintritt des Hungerzustandes nimmt unter Vermehrung und Vergrößerung der Vakuolen die Zahl der Granula zu, welche teils über das ganze mehr weniger grobschaumige Cytoplasma verteilt oder 25 an einzelnen Stellen angehäuft sind. Auch die Vakuolen enthalten Granula, welche sich in sehr lebhafter, wimmelnder Bewegung befinden

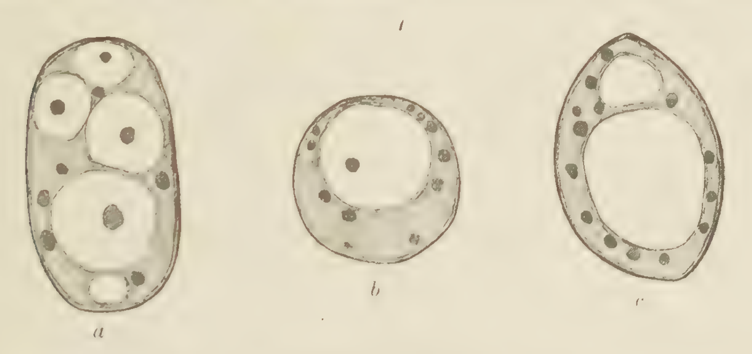


Fig. 47. Verteilung der größeren Granula in mäßig hungernden Zellen von untergäriger Bierhefe im grobschaumigen Plasma. Bodensatzhefe aus einer Würzekultur. Granula in der Umgebung der Vakuolen. Die Granula innerhalb der Vakuolen in lebhafter Bewegung. — Vergr. ca. 2000. Nach WILL.

(*Fig. 47*). Die Zellen sterben dann ab, der plasmatische Inhalt löst sich auf, und hierdurch erhalten die Granula, welche teilweise durch Verschmelzung größeren Umfang angenommen haben, im Zellinhalt das 30 Uebergewicht. Schließlich werden von der Zellhaut nur mehr geringe Ueberreste der hyalinen, widerstandsfähigeren Plasmahaut eingeschlossen, während die Zahl der Granula ab- und die Größe derselben zugenommen hat. Einzelne Zellhäute sind nur von wenigen, sehr großen Fett- oder Oeltropfen nahezu ganz erfüllt. Bei der Autolyse der hungernden und 35

allmählich absterbenden Zellen vereinigen sich also nicht nur die ursprünglich vorhandenen Granula und wird damit ihre Zahl reduziert, sondern es entstehen in demselben Maße, als der plasmatische Inhalt aufgelöst wird, neue, und damit wird den schon vorhandenen neue Fett- oder Oelsubstanz zugeführt, infolgedessen auch ihre Größe zunimmt.

Die Hefenzelle wird also beim Absterben und bei der allmählichen Auflösung immer ärmer an plasmatischen Bestandteilen, während der Fettgehalt zunimmt.

Die großen, in absterbenden oder schon abgestorbenen Zellen eingeschlossenen Oelkörperchen und Fettropfen sind schon oft von einem ungeübten Auge für endogene Sporen gehalten worden, mit welchen sie allerdings, wenigstens mit denjenigen gewisser Arten, eine entfernte Aehnlichkeit besitzen. In Zweifelsfällen lassen jedoch die später angegebenen mikrochemischen Reaktionen und der Keimversuch sofort eine Entscheidung treffen.

Die **Größe** der Granula ist also eine sehr verschiedene. In den lebenden Zellen bleiben sie meist klein und messen nur wenige Bruchteile eines Mikromillimeters, vereinzelt finden sich jedoch, wie dies Will (3) an den Dauerzellen der Hefe beobachtet hat, auch keimungsfähige, also lebende Zellen, welche nur einen einzigen stark lichtbrechenden Körper enthalten. Zuweilen sind nahezu alle Zellen einer Kultur offenbar in krankhaftem Zustand anstatt mit Glycogen von einer öligen oder fettigen Substanz in sehr großen Tropfen durchsetzt, oder das Glycogen tritt wenigstens sehr stark gegenüber ersteren zurück.

Bei denjenigen Hefen- und Sproßpilzarten, bei welchen die Zahl der Oelkörperchen eine beschränkte ist, wie bei *S. anomalus*, *Mycoderma* und insbesondere bei manchen *Torula*-Arten, sind sie in der Regel auch etwas größer als in den lebenden und in normaler Weise vegetierenden Zellen derjenigen Arten, welche viele einschließen. In 24 Stunden alten Kulturen von *Mycoderma* sind nach den Beobachtungen von Will (7) Oelkörperchen an denjenigen Stellen der Zellen, an welchen sie in älteren Kulturen hervortreten, noch nicht sichtbar. Nach Zusatz von Jod kommen hier jedoch schon stärker gefärbte, dichtere Körnchen zum Vorschein. In 48 Stunden alten Kulturen sind in einzelnen Zellen die Oelkörperchen auch ohne Reagens sichtbar; allerdings sind sie noch klein. Sie wachsen weiter und erreichen in sehr alten Kulturen einen Durchmesser bis zu 2 μ. Aehnlich verhalten sich die Oelkörperchen bei den *Torula*-Arten.

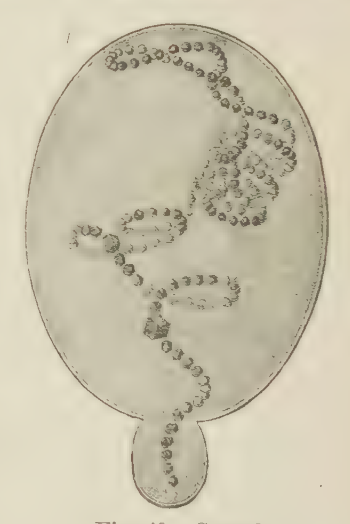


Fig. 48. Granula in einer lebenden Zelle von Preßhefe, welche in Sprossung begriffen ist. Mehrere der Granula sind deutlich vieleckig, zwei davon überdies noch beträchtlich größer als alle anderen. Die Granula in einer Reihe, dem Zentralfaden, geordnet. Die zwei weißen Kreisflächen stellen Vakuolen vor. — Vergr. 4400. Nach Hieronymus.

Die **Gestalt** der Granula ist nicht immer die gleiche; in der Regel nähert sich dieselbe der Kugelform. Nach den Beobachtungen von Hieronymus sind sie eckig (*Fig. 48*), die Ecken jedoch abgestumpft, wodurch sie mehr rundlich erscheinen. Zuweilen nehmen sie Kristalloid-

form an und es ist auch zufolge HIERONYMUS die Form der mehr oder weniger rundlichen Granula als Kombination des Würfels, welchen er zuweilen in den Vakuolen gefunden hat, mit dem Oktaeder zu betrachten. JANSSENS und LEBLANC (1) bezweifeln dies zwar und meinen, daß die eckigen Umrisse durch eine schlechte Entwässerung der Zellen 5 beim Färben entstehen und die Beobachtung von Kristalloiden auf Täuschung beruht, die durch mehrere nahe beieinander liegende Granula hervorgerufen werden könne.

Bei *Mycoderma* werden die Oelkörperchen bei der Einwirkung von Reagentien unregelmäßig: mit Osmiumsäure nehmen sie nach den Be- 10 obachtungen von WILL (7) zuweilen sogar kristalloidähnliche Form an. Schon KLÖCKER (1) hat die Veränderlichkeit der Form der Granula durch Osmiumsäure bei *Saccharomyces apiculatus* bemerkt.

In betreff der **Verteilung** der Granula innerhalb der Hefenzellen hat bereits J. RAUM die Bemerkung gemacht, daß ihre Anordnung bei 15 den von ihm untersuchten Arten (*S. cerevisiae I, S. ellipsoideus I* und *II, S. Pastorianus I* und anderen) nahezu konstant eine gewisse Regelmäßigkeit zeigt, indem sie Kreisbögen oder deren Segmente darstellen. Die Granula lagern entweder in der Mitte der Zelle oder, was häufiger der Fall ist, in den äußeren Partien derselben. Häufig umgeben sie im 20 optischen Querschnitt die Vakuolen kranzförmig (vgl. *Fig. 47*), bei normalen oder wurstförmigen Zellen erscheinen sie zuweilen dicht gedrängt an den Polen der Zelle gruppiert, so daß man bei schwächerer Vergrößerung, welche die Gruppe der Granula nicht in ihre Bestandteile auflöst, ähnliche Bilder wie bei den Zellen von *S. anomalus* und *Myco-* 25 *derma* erhält. Ueberhaupt wird die Mannigfaltigkeit in der Verteilung und in der Anordnung der Granula eine ungemein große, sobald man die Hautgenerationen der Hefen in Flüssigkeitskulturen oder in Riesenkolonien mit in Betracht zieht. Diese läßt wohl berechtigte Zweifel darüber aufkommen, ob die Regelmäßigkeit, welche RAUM und vor allen 30 HIERONYMUS in der Anordnung der Granula in der gewöhnlichen Bodensatzhefe gefunden haben wollen, bei allen Generationen und Anpassungsformen der Hefe vorhanden ist.

Vorausgeschickt muß werden, daß nach der Annahme von HIERONYMUS das Protoplasma faserige Struktur besitzen soll. Die im Cytoplasma 35 sichtbaren Granula sollen stets in Reihen in einer dieser plasmatischen Fasern, welche HIERONYMUS als Zentralfaden bezeichnet, liegen, und diese Reihen in einer mehr oder weniger regelmäßigen Spirale oder auch zu einem Knäuel zusammengerückt erscheinen (vgl. *Fig. 48*). Oft ist dieser Knäuel ziemlich locker und kann dann über einen großen Teil 40 des Zellraumes sich ausbreiten. Ob mehrere derartige Zentralfäden vorhanden sind, konnte mit Sicherheit nicht erwiesen werden. Die körnchenfreien Lücken erklärt HIERONYMUS damit, daß der Zentralfaden sehr körnchenarm und infolgedessen selbst schwer erkennbar sei.

Neben den unmittelbar sichtbaren Körnchen hat aber HIERONYMUS 45 bei Preßhefenzellen nach Fixierung mit irgendwelcher Fixierungsflüssigkeit in dem vorher homogen erscheinendem Protoplasma auch noch solche auftreten sehen, die in ganz ähnlicher Weise stets in Reihen gelagert waren.

ZIMMERMANN (2) stellt nach den Beobachtungen von A. GÖRTZ diese 50 regelmäßige Anordnung der Granula, überhaupt eine fibrilläre Struktur in den Hefenzellen, in Abrede, und es muß auch noch als zweifelhaft erscheinen, ob RAUM die gleiche Anordnung wie HIERONYMUS meint, oder

ob er nicht vielmehr nur die im optischen Querschnitt kreisförmig erscheinende Lagerung der Granula in der Umgebung der Vakuolen im Auge hat. BUSCALIONI (1) hat den „Zentralfaden" bei seinem *Sacch. guttulatus* nicht beobachtet. Auch neuerdings sprechen sich R. und 5 W. ALBERT (1) dahin aus, daß sie niemals eine reihen- und fadenförmige Anordnung der Protoplasmakörnchen, wie sie die Granula bezeichnen, beobachten konnten, daß dieselben dagegen anfangs die ganze Zelle gleichmäßig erfüllen. Nur CASAGRANDI (2) bestätigt in einem gewissen Sinne die Befunde von HIERONYMUS. Er konnte in einigen Fällen genau 10 eine reihenförmige Anordnung der Granula beobachten, welche einen einzigen Kreis um die größte Achse der Hefenzellen beschrieben. In anderen Fällen konnte festgestellt werden, daß die Reihe der Granula eine Spirallinie mit enger werdender Aufwindung bildete, welche sich in einer großen Anzahl von untereinander parallelen Windungen dicht 15 an der Zellhaut hinzog. Endlich waren die Granula kranzförmig an einer Stelle im Cytoplasma angeordnet, gleichsam als ob sie auf einer rundlichen, im frischen Zustand nicht sichtbaren Masse festgeheftet wären. Im übrigen kann ich CASAGRANDI darin nur beistimmen, daß derartige Anordnungen nicht immer so regelmäßig und konstant vorhanden sind.

20 Sichtlich unter dem Einfluß von BÜTSCHLI's Lehre vom Bau des Protoplasmas haben JANSSENS und LEBLANC (1) die in Rede stehenden Gebilde für die Knoten des Netzes erklärt, welches sie in dem Cytoplasma der Hefenzellen beobachtet haben (*Fig. 49*). Das Be-25 stehen eines maschigen, schwammartigen Gerüstes ist auch von mir festgestellt worden, ebenso an den Knotenpunkten schärfer hervortretende Partien. Ich kann jedoch LAFAR darin nur beistimmen, daß die Identi-30 tät dieser Knoten und der schärfer hervortretenden Partien mit den Gebilden, welche wir als Granula bezeichnen, nicht erwiesen ist. Uebrigens unterscheiden JANSSENS und LEBLANC noch eine zweite Art von Granu-35 lationen, welche sie bei auf Gipsblöcke zwecks der Sporenbildung gebrachter Hefe beobachtet haben. Dieselben erfüllten mehr oder weniger vollständig die Räume des netzförmigen Gerüstes des Cytoplasmas.



Fig. 49. Belgische Bierhefe nach 44-stündigem Verweilen in Würze; in lebendigem Zustande beobachtet. Zeigt das im Text genannte Plasmanetz mit seinen Knoten. Der Zellkern ist nicht abgebildet. — Vergr. ca. 2000. Nach JANSSENS und LEBLANC.

§ 16. Bau der Granula. Verschiedene Arten. Verhalten gegenüber 40 Reagentien.

Die Untersuchungen von WILL (3) über den anatomischen Bau der Granula haben erst einige Aufklärung über die Natur und damit über das Verhalten derselben gegenüber Reagentien gebracht. Diese führen dazu, mindestens zwei Arten von Granula anzunehmen. WILL unter-45 suchte Reinkulturen verschiedener Bierhefen und zwar hauptsächlich die Dauerzellen und die Kahmhautgenerationen, außerdem Reinkulturen von *Mycoderma*, *S. anomalus* und *Torula*.

Die Granula sind nicht immer einheitlich zusammengesetzt. In den meisten Fällen bestehen sie in der lebenden Zelle aus einer plastischen 50 Grundsubstanz eiweißartiger Natur, welche von Fettsubstanzen (im all-

gemeinsten Sinne durchsetzt ist. Werden letztere durch Lösungsmittel entfernt, so erscheint die Grundsubstanz häufig wie ein feinhäutiges Bläschen, welches zuweilen auch noch durch ein Maschenwerk (*Fig. 50*) ausgefüllt ist. Da die Granula offenbar befähigt sind, miteinander zu verschmelzen, so ist daraus zu schließen, daß die Grundsubstanz nicht fest, sondern zähflüssig, plastisch und auch unter verschiedenen Bedingungen in der lebenden Zelle in ihrer Form und ihrem Aufbau sehr wechselnd ist. Die Hauptmenge der Grundsubstanz kann unter Umständen auf der Außenseite der Fettsubstanz lagern und dieselbe, mehr weniger verdichtet, ähnlich einer Haut, umgeben. In anderen Fällen spannen sich jedoch von dieser Umhüllung mehr oder minder starke Fäden durch die Fettsubstanz hindurch, das Granulum mit einem Maschenwerk erfüllend, in welches die Fettsubstanz eingebettet erscheint.



Fig. 50. Dauerzelle von untergäriger Bierhefe mit einem sehr großen, aus der Verschmelzung kleinerer hervorgegangenen Oelkörperchen. Nach Behandlung mit Alkohol. Das Oelkörperchen ist im Innern durch ein Maschenwerk ausgefüllt, in welches die Fettsubstanz eingelagert war. — Vergr. ca. 2000. Nach WILL.

Die Grundsubstanz kann erst infolge der Behandlung mit den Lösungsmitteln für die Fettsubstanz, z. B. mit Alkohol, Häutchenform annehmen, unbedingt notwendig erscheint dies jedoch nicht, und läßt sich nach den an anderen ähnlich gebauten Fettkörperchen in natürlichen Substanzen sowie in künstlichen Gemischen gemachten Beobachtungen die Hautform der Grundsubstanz sehr wohl erklären. O. CASAGRANDO möchte das Netzwerk, welches in großen Körperchen nicht selten beobachtet wird, als ein Produkt der Gerinnung, hervorgerufen durch die fettlösenden Reagentien, betrachten. Die Möglichkeit einer solchen Gerinnung erscheint nicht ausgeschlossen, immerhin lassen die direkt bei Verschmelzung gewisser plastischer, nicht einheitlich zusammengesetzter Körperchen angestellten Beobachtungen die gerade an großen, offenbar ebenfalls aus der Verschmelzung vieler kleiner hervorgegangenen Granula beobachtete Erscheinung auf natürlichem und einfachem Weg erklären. In einem gegebenen Moment hat der größere Teil der die einzelnen Körperchen hüllenartig umgebenden Grundsubstanz sich vereinigt und nach der Peripherie des Verschmelzungsproduktes zurückgezogen, immerhin durchziehen noch ihre Reste ähnlich einem Maschenwerk das Innere des neu entstandenen größeren Körperchens.

Der eben geschilderte Aufbau wurde von WILL in der Regel an den die Dauerzellen dicht erfüllenden Granulis sowie ferner an den in der Ein- bis Dreizahl normal in den Zellen von *Mycoderma* und *S. anomalus* vorhandenen Oelkörperchen beobachtet. Auch die meist in der Einzahl im Plasma der typischen *Torula*-Zellen eingebetteten Granula zeigen, soweit die ziemlich umfassenden Beobachtungen reichen, den gleichen Aufbau. Bei sehr weitgehender Reduktion des Plasmas ragen die zuweilen sehr großen Granula, von einer zarten Plasmaschicht überzogen, weit in die einzige Vakuole hinein.

Die von WILL für diese, in der lebenden Zelle der verschiedenartigsten Sproßpilze normal auftretenden, stark lichtbrechenden Körnchen gebrauchte Bezeichnung „Oelkörperchen", hat also jedenfalls ihre volle Berechtigung und kennzeichnet, da sie den Aufbau und die chemische Zusammensetzung dieser Art von stark lichtbrechenden Körperchen um-

faßt, die obwaltenden Verhältnisse treffender als alle anderen bisher gebrauchten Bezeichnungen.

Neben den „Oelkörperchen“ findet sich sowohl bei den Saccharomyceten wie bei den *Mycoderma-* und *Torula*-Arten sicher noch eine zweite Kategorie von stark lichtbrechenden Körperchen, die gleichfalls aus fettigen und öligen Substanzen bestehen; eine eiweißartige Grundsubstanz geht denselben jedoch ab. Sie mögen kurz als Fett- oder Oeltröpfchen bezeichnet werden. Diese Fetttröpfchen stellen sich nicht nur, wie oben geschildert, bei dem allmählichen Absterben der Zelle und der Auflösung der plasmatischen Inhaltsbestandteile ein, sondern sie sind schon in der lebenden Zelle vorhanden und zwar meiner Anschauung nach anscheinend unter bestimmten Verhältnissen öfter, als man bisher anzunehmen gewohnt war. Bei der Kleinheit, welche die Objekte in der Regel besitzen, ist es jedoch ungemein schwer, in den einzelnen Fällen einen sicheren Entscheid da zu bringen, wo offenbar beide Arten von Granula vorhanden sind. Ich selbst konnte solche Oel- oder Fetttröpfchen neben Oelkörperchen in den lebenden Zellen von Saccharomyceten, insbesondere der Hautgenerationen in älteren Kulturen, welche infolge ihrer Größenverhältnisse der Untersuchung etwas zugänglicher sind, von den meisten Autoren jedoch nicht berücksichtigt wurden, nachweisen. Zu untersuchen würde noch sein, ob nicht die in sehr großer Zahl und verhältnismäßig rasch auftretenden stark lichtbrechenden Körperchen bei Hefenzellen, welche dicht mit Glycogen gefüllt waren und durch intensive Berührung mit der atmosphärischen Luft rasch zum Veratmen desselben gebracht wurden, ein Gemenge beider Arten, die auch nach ihrem Ursprung verschieden sind, darstellen.

Nicht allein das bis jetzt allerdings vereinzelte Vorkommen von gefärbten Granulis neben den in der Mehrzahl der Fälle ungefärbten sowie ihr verschiedenartiger Aufbau zwingen zur Annahme von mehreren Gruppen derselben, sondern auch ihr Verhalten gegenüber Reagentien läßt verschiedene Gruppen erkennen, wenngleich in diesem Falle nicht prinzipielle Unterschiede angenommen werden müssen, da die Möglichkeit vorliegt, daß ursprünglich substantiell und nach ihrem Ursprung gleiche Arten von Körperchen sich allmählich in verschiedener Weise veränderten.

Schon Eisenschitz (1, 2) glaubte nach dem Verhalten der Granula der von ihr untersuchten Hefenarten gegenüber Farbstoffen auf eine Verschiedenartigkeit derselben schließen zu müssen. Die am Rand der Vakuole und innerhalb dieser liegenden Körperchen sollen verschieden von den im übrigen Plasma sichtbaren sein. Beim Zusatz von reiner konzentrierter Salzsäure sollen die Körnchen am Rand der Vakuole verschwinden und sich mit Methylgrün nicht mehr färben, während die übrigen Körnchen im Plasma infolge der Salzsäurewirkung deutlich hervortreten.

Curtis (1) will eine Unlöslichkeit der großen Granula seiner Hefen in Aether und Benzin, also ebenfalls zwei nach ihrem Verhalten gegenüber Lösungsmitteln verschiedene Arten beobachtet haben. Auch Paul Ernst (2) unterscheidet bei seinen Untersuchungen an einer Hefe aus der Luft und *Saccharomyces ...formans* nach ihrer verschiedenen Färbbarkeit in der lebenden Zelle zwei Arten von Granula. Im übrigen bedürfen seine Angaben über fädige Verbindungen der Körnchen und die eigentümlichen Erscheinungen bei der Färbung noch der kritischen Nachprüfung.

Casagrandi nimmt entschieden dagegen Stellung, verschiedene Arten

von Granula auf Grund ihres Verhaltens gegenüber Farbstoffen anzunehmen. Die Granula sollen sich nach seinen Beobachtungen alle färben, im allgemeinen die großen runden, im Plasma zerstreuten schneller als die kleinen eckigen, die alten schneller als die jungen und die an der Peripherie gelegenen schneller als die zentralen. Nach meinen eigenen 5 Beobachtungen geht damit CASAGRANDI entschieden zu weit.

Das eigenartige **Verhalten gegen Reagentien**, welches die Oelkörperchen aufweisen, erklärt sich aus ihrem Aufbau. Mit Ausnahme von RAUM und KRASSER [1] sind alle übrigen Beobachter völlig übereinstimmend zu dem Befund gelangt, daß die Granula durch Einwirkung 10 von einprozentiger Ueberosmiumsäure, also dem wichtigen Reagens auf Fett, sich bräunen. Mit Alkannatinktur nehmen die Oelkörperchen der Dauerzellen eine intensiv zinnoberrote Färbung an. Bei den Oelkörperchen von *Mycoderma* gelingt in der Regel eine Färbung mit diesem Reagens nicht, da durch den Alkohol der Alkannatinktur eine teilweise 15 Lösung stattfindet; zuweilen ist jedoch eine solche sehr deutlich.

Die Lösung der Fettsubstanz in den Oelkörperchen und Oeltröpfchen in Alkohol, Aether, Benzol und Schwefelkohlenstoff bei gewöhnlicher Temperatur gelingt, wie schon WILL hervorgehoben hat, nur schwierig. Selbst eine 8 Monate hindurch fortgesetzte Einwirkung von Alkohol 20 ergab, daß noch nicht in allen Zellen die Fettsubstanz gelöst war. Bei der Behandlung in der Siedehitze wird zwar die Lösungsfähigkeit in den angeführten Mitteln erhöht, immerhin muß dieselbe jedoch auch in diesem Falle längere Zeit hindurch fortgesetzt werden. Die Löslichkeit in Aether, Benzol und Schwefelkohlenstoff ist eine größere als in Alkohol. 25 Uebrigens ist die Löslichkeit in verschiedenen Kulturen und sogar in den einzelnen Oelkörperchen eine sehr verschiedene. Zuweilen löst sich die Fettsubstanz unmittelbar beim Bespritzen eines Präparates mit Alkohol. Die Fettsubstanz in den Oelkörperchen der *Mycoderma*-Zellen löst sich in Alkohol verhältnismäßig leicht. Die schwierige Löslichkeit 30 der Fettsubstanz ist jedenfalls durch verschiedene Ursachen bedingt, bei welchen vielleicht die verschiedene Beschaffenheit der Fettsubstanz selbst eine gewisse Rolle spielt, hauptsächlich scheinen es aber äußere Ursachen zu sein, welche den Zutritt der Lösungsmittel in die lebenden Zellen erschweren. In erster Linie kommt bei Kahmhautgenerationen 35 die Zwischensubstanz (in der Hauptsache wohl von der Verschleimung der Zellhäute herrührend), in welche die Zellen eingebettet sind, in Betracht. Diese koaguliert durch die Lösungsmittel und hierdurch wird deren Eintritt in die Zelle und die Diffusion des gelösten Fettes erschwert. Außerdem ist noch in Betracht zu ziehen, daß der Zellmembran 40 und dem Plasma, in welchem die Oelkörperchen verteilt sind, sowie diesen selbst Wasser entzogen wird. Hierdurch wird aber dem Eindringen der Lösungsmittel ebenfalls ein Widerstand entgegengesetzt. In toten Zellen mit geringen plasmatischen Resten, bei welchen diese Widerstände in Wegfall kommen, erfolgt unter im übrigen gleichen 45 Bedingungen die Lösung der Fettsubstanz rascher als in lebenden Zellen. Die durch einen Druck aus den Zellen ausgestoßene und dann zu großen Tropfen vereinigte Fettsubstanz löst sich in absolutem Alkohol sofort. Jedenfalls bedarf es also, wie auch CASAGRANDI bestätigen konnte, im allgemeinen einer längeren Dauer der Einwirkung, um einen Erfolg 50 zu erzielen. Läßt man es an der nötigen Geduld fehlen, so wird man leicht zu dem Schluß verleitet, daß das Lösungsmittel wirkungslos sei, wie dies z. B. von RAUM dem Aether-Alkohol-Gemisch, von HIERONYMUS

auch der konzentrierten Kalilauge und von CURTIS dem Aether und Benzin nachgesagt worden ist.

Nach Entfernung der Fettsubstanz aus den Oelkörperchen gibt die meist in Form einer hautartigen Hülle zurückbleibende **Grundsubstanz** alle Reaktionen, welche für Eiweiß kennzeichnend sind. Sie speichert also Jod mit gelber bis gelbbrauner Farbe auf, mit Salpetersäure und Ammoniak färbt sie sich citronengelb (Xanthoproteinsäure-Reaktion), mit dem RASPAIL'schen Reagens zeigt sie eine schwache Rosafärbung, die teilweise allerdings auch der Fettsubstanz selbst zukommt, mit frisch bereitetem MILLON'schen Reagens nimmt sie, im Gegensatz zu den Angaben von GUILLIERMOND, eine ziegelrote Färbung an; vgl. auch WILL (5). Eine der wichtigsten Reaktionen der Granula besteht nach den Beobachtungen von WILL (3) in dem Verhalten gegenüber konzentrierter Schwefelsäure. Zunächst werden die plasmatischen Teile des Zellinhaltes gelöst, dann fließen die kleinen Körperchen zusammen und bilden entweder einen oder mehrere Tropfen, welche meist durch die gequollene Membran hindurch entleert werden. Die Reaktion ist nun eine verschiedene, je nachdem die Gärungsform, die gewöhnliche nach der Hauptgärung abgesetzte Bodensatzhefe, oder die Kahmhautgenerationen und die Dauerzellen sowie die Zellen der Rindenschichte der Riesenkolonien vorliegen. Im ersteren Falle bleiben die Tropfen nach den bis jetzt vorliegenden Beobachtungen stets farblos, im letzteren tritt dagegen eine in den verschiedensten Abstufungen sich bewegende Färbung auf. In ausgesprochenster Weise verläuft sie derart, daß sich die Tropfen sehr rasch braun, dann smaragdgrün, weiterhin blaugrün (Alizaringrün) und zuletzt blauschwarz färben. In der Regel färben sie sich jedoch nur mehr oder weniger ausgesprochen graugrün und zuletzt schwarzbraun oder blauschwarz. Durch die Schwefelsäurereaktion kann die Gegenwart von Hautzellen in der gewöhnlichen Bodensatzhefe nachgewiesen werden. Für die Identität der Zellen der Riesenkolonien auf festen Substraten mit den Hautzellen auf flüssigen bildet die Schwefelsäurereaktion der Oelkörperchen ein wichtiges Beweismittel. Es geht aus derselben auch hervor, daß die Oelkörperchen der Bodensatzhefe, der Gärungsform, und der Hautgenerationen, eingeschlossen die Dauerzellen, sowie diejenigen der Rindenschichte der Riesenkolonien hinsichtlich der chemischen Beschaffenheit der Fettsubstanz (denn auf diese ist wohl hauptsächlich die Schwefelsäurereaktion zurückzuführen) sich verschieden verhalten.

Nicht nur in morphologischer Beziehung sondern auch in chemischer drängen also die Erscheinungen dazu, mindestens zweierlei Arten von Granula anzunehmen, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß die chemische Zusammensetzung der Fettsubstanz auch im Laufe der Zeit eine kompliziertere werden kann.

Die Reaktion mit anderen Säuren hat kaum etwas Charakteristisches; die Körperchen zeigen nur das Bestreben, sich in glänzende Tröpfchen zu verwandeln, welche sich zur Bildung größerer vereinigen. Auch bei der Behandlung mit Alkalien verwandeln sie sich in Tröpfchen; eine Auflösung tritt nicht ein.

Durch Behandlung mit Magensaft, anhaltendes Kochen und Mazeration mit dem SCHULTZE'schen Gemisch werden sie gleichfalls in Tröpfchen umgewandelt; es wird hierdurch die eiweißartige Grundsubstanz, soweit eine solche vorhanden ist, verdaut bzw. zerstört und die Fettsubstanz freigemacht.

Die Auflösung der hüllenartigen Grundsubstanz durch Magensaft läßt darauf schließen, daß diese aus verdaubaren Eiweißkörpern besteht und daß also Nuclein in den Oelkörperchen nicht vorhanden ist, eine Schlußfolgerung, welche auch RAUM, JANSSENS und LEBLANC sowie GUILLIERMOND gezogen haben. KRASSER ist zwar der Anschauung, daß die glänzenden Körnchen, welche in künstlich verdauten Hefenzellen vorkommen, der Hauptmasse nach sicher kein Nuclein sind, jedoch sollen auch Ausnahmen vorkommen. Es mag um so mehr dahin gestellt bleiben, inwieweit diese Schlußfolgerung ebenso wie die Angabe von EISENSCHITZ, daß die Körnchen in gewissen Teilen des Plasmas nach der Behandlung mit Magensaft nicht mehr hervortreten, richtig sind, als sie noch in eine Zeit fallen, in welcher die Löslichkeit der Granula in Alkohol und Aether in Abrede gestellt wurde und bei EISENSCHITZ sichtlich Beobachtungsfehler vorliegen. R. und W. ALBERT haben bei ihren Versuchen über die Selbstverdauung von Dauerhefe festgestellt, daß die Granula durch das proteolytische Enzym der Hefe schwerer verdaulich oder mindestens schwerer löslich als die übrigen Zellinhaltsstoffe sind.

§ 17. Die Konsistenz der Granula. Natürlich gefärbte Granula. Differenzierung durch Färbung. Bedeutung für die Zelle.

Der Festigkeitszustand (Konsistenz) der Granula ist wahrscheinlich ein verschiedener. Nach den Untersuchungen von WILL (3) stellen die Oelkörperchen nicht einen mehr oder weniger flüssigen Tropfen sondern eine halbweiche Masse dar. Bei gelindem Druck auf das Deckglas werden die größeren breit gedrückt, wobei sie entweder an einer oder an mehreren Stellen vom Rande her einreißen und in letzterem Falle Kreuz- oder Sternform annehmen (*Fig. 51*), oder sie zerfallen in kleine, eckige oder kantige Stücke. Die größten Oelkörperchen sind nicht immer die festesten. Die Konsistenz der Oelkörperchen kann also unter Umständen sehr fest werden. Offenbar ist hierbei in erster Linie die Fettsubstanz beteiligt. Je mehr dieselbe erstarrt, ist es auch möglich, daß sie Kristalloidform annimmt und bei dem Zurücktreten der eiweißartigen Hülle das Oelkörperchen eckige oder selbst kristallähnliche Form erhält, wie sie HIERONYMUS beobachtet hat. Andrerseits finden sich jedoch auch Oelkörperchen, aus welchen die Fettsubstanz bei stärkerem Druck leicht in Tropfenform ausgestoßen wird. Da sich diese Tropfen leicht vereinigen, müssen sie auch flüssiger sein. Außerdem finden sich sicher Oeltröpfchen, also Oel- oder Fettsubstanz ohne Hülle, welche mehr oder weniger flüssig sind.

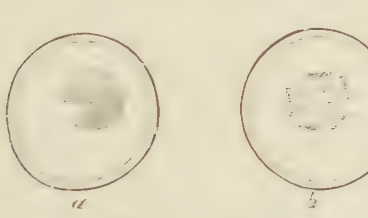


Fig. 51. Granula in toten Dauerzellen von untergäriger Bierhefe durch einen Druck auf das Deckglas breitgedrückt und vom Rande her eingerissen. — Vergr. ca. 2000. Nach WILL.

Ueber die chemische Zusammensetzung des fettigen Inhaltes der Granula läßt sich zurzeit noch nichts Genaueres sagen. Es ist jedoch auf die Beobachtung von WILL hinzuweisen, daß beim Eintrocknen von dichteren Schichten älterer Kahmhautzellen, welche sehr reich an Oelkörperchen und Oeltröpfchen sind, Fettflecken erzeugt werden, welche

bald wieder verschwinden. Diese Erscheinung spricht für die Gegenwart eines flüchtigen Oeles.

Bemerkt sei an dieser Stelle, daß nach den Beobachtungen von WILL (5) in den vegetativen Zellen sowie in den Sporen von *Sacch.* 5 *Ludwigii* unter dem Einfluß des Lichtes rotgelb gefärbte Fettkörperchen entstehen. Die Kulturen nehmen mit zunehmendem Alter eine ziegelrote Färbung an. Die sehr intensiv gefärbten Zellen des Ringes der von JANSSENS und MERTENS (1) beschriebenen roten *Torula* sind mit sehr stark lichtbrechenden, orangerot gefärbten Körperchen erfüllt, welche 10 wie Oeltropfen aussehen, zum größten Teil jedoch aus Carotin (s. Bd. I, S. 286) bestehen. Fett scheint in denselben nicht vorhanden zu sein.

Zum Zweck des unterscheidenden **Färbens** kann man das von P. ERNST (1) empfohlene und von RAUM erprobte Verfahren anwenden, demzufolge man das Präparat mit gelinde erwärmter LOEFFLER'scher 15 Methylenblaulösung behandelt, dann mit Wasser wäscht und schließlich mit kalter Lösung von Bismarckbraun nachfärbt, worauf die Granula schwarz erscheinen und von dem umgebenden braun gefärbten Plasma sich gut abheben. Eine Unterscheidungsfärbung der Hüllen der Granula läßt sich durch das von CASAGRANDI empfohlene Verfahren erreichen. 20 Man fixiert die Hefenzellen durch alkoholische Lösung von Sublimat, zieht hierauf den fettigen Inhalt der Granula mittels absoluten Alkohols aus, färbt in 20-proz. Fuchsinlösung und entfärbt mit Pikrinsäure (1 Teil) und Wasser (2 Teile). Die Hüllen der Granula erweisen sich als rot gefärbt und heben sich von dem sie umgebenden gelbgefärbten Plasma 25 recht deutlich ab.

Mit Methylenblau wie mit vielen anderen Farben nehmen die Granula nach GUILLIERMOND in charakteristischer Weise eine rote Färbung an, während das Plasma blau gefärbt erscheint. Mit dem gleichen Farbstoff kann die Färbung je nach der Dauer der Färbung und Ent- 30 färbung eine verschiedene sein. Eine kurze Färbung gibt ein tiefes Blau oder Violett, eine länger andauernde erzeugt die rote Färbung. KUNSTLER und BUSQUET (1) schreiben die Farbenerscheinung einer Diffraktion und nicht einer Färbung zu. GUILLIERMOND nimmt jedoch an, daß es sich um einen chemischen Vorgang handelt, und nicht um eine physikalische 35 Erscheinung. Sehr anschaulich sind die Bilder, welche GUILLIERMOND beim vorsichtigen Auswaschen mit Methylenblau gefärbter Granula bei *Dematium* erhalten hat; hier kommt der Bau derselben deutlich zum Ausdruck. Die Granula erscheinen in der Mitte blaßrot gefärbt, während sie von einer violett-blau gefärbten Hülle umgeben sind. Nach 40 dem, was wir jetzt über den anatomischen Bau der Oelkörperchen wissen, scheint es also die Fettsubstanz zu sein, welche die rote Färbung derselben verursacht und uns die Erscheinungen, welche beim Färben auftreten, verstehen lehrt. Je mehr die Fettsubstanz überwiegt und je mehr die Hülle zurücktritt, desto ausgesprochener wird die rote Färbung 45 sein. Drückt man auf ein mit Methylenblau oder Hämatoxylin gefärbtes Präparat, so daß die Oelkörperchen zertrümmert und die Fettsubstanz verteilt wird, so nehmen die Trümmer eine viel ausgesprochener rote Färbung an. Auch bei den Erscheinungen, welche sich bei der Auflösung der Granula darbieten, kommt dies sehr deutlich zum Ausdruck.

50 An dieser Stelle mag daran erinnert sein, daß WRÓBLEWSKI (1) aus Hefenpreßsaft geringe Mengen einer stark sauer reagierenden öligen Substanz gewonnen hat. Ich selbst habe ebenfalls einen ähnlichen Körper in sehr geringen Mengen in dem Aetherauszug der Absätze,

welche sich bei der Bereitung und Klärung von „Suppenextrakt" aus Hefe bilden, gewonnen. Möglicherweise gibt das Verhalten dieser Substanz gegenüber den verschiedenen Farbstoffen einen Anhaltspunkt zur Beurteilung der beim Färben der Granula auftretenden Erscheinungen.

Auch im lebenden Zustand der Zelle nehmen die Granula gewisse 5 Farbstoffe auf, so z. B. wenn man nach dem Vorschlag von Eisenschitz die Hefenzellen in Bierwürze züchtet, welche man mit einprozentiger Benzopurpurinauflösung versetzt hat. Nach ein bis zwei Tagen schon zeigen sich dann rot gefärbte Granula. Methylenblau färbt sie ebenfalls; das Zellplasma bleibt gewöhnlich ungefärbt, während die Granula den 10 Farbstoff aufspeichern, wobei sie ihre lebhafte Bewegung in den Vakuolen nicht einbüßen.

Mehrfach finden sich Angaben über **Eigenbewegung**, also von Ortsveränderungen, welche die Granula ausführen sollen. Abgesehen von der lebhaften, wimmelnden oder tanzenden Bewegung, welche die 15 in den Vakuolen eingeschlossenen Körperchen nicht selten ausführen, müssen diese Angaben mit sehr kritischem Blick betrachtet werden.

Nach Raum und Hieronymus sollen in vielen Fällen während der Ausstülpung einer Tochterzelle aus der Mutterzelle Granula in den jungen Sproß hinüberwandern. Beobachtet man jedoch fortgesetzt unter dem 20 Mikroskop den Verlauf der Entwicklung der Tochterzelle, so ist eine Wanderung nicht wahrnehmbar: die Granula entstehen vielmehr in der Tochterzelle selbst. Die Angabe von Eisenschitz (2), daß die Granula zuweilen aus der Vakuole auswandern, sich weiter bewegen und sogar aus dem Plasma heraustreten können, um sich an der äußeren Zellwand 25 anzulegen, beruht offenbar auf Beobachtungsfehlern. Wir finden bei Eisenschitz die Vermutung von Vorgängen ausgesprochen, welche B. Fischer (1) direkt beobachtet zu haben glaubte, nämlich die, daß der Austritt der Körnchen nur ein Vorstadium der Sprossung sei. Die Angabe von B. Fischer ist als auf unrichtiger Beobachtung beruhend 30 längst berichtigt. Auch die an den Hefenzellen pendelnden, öfters gestielen, oft halbkugeligen und breitaufsitzenden Knöpfchen und Knöllchen, welche nach den Angaben von P. Ernst (2) aus der Zelle austreten sollen, sind jedenfalls nicht als ausgetretene Granula zu betrachten, wie dies Ernst vermutet. Daß die in den Vakuolen befindlichen Granula 35 zuweilen verschwinden, hat kürzlich wieder W. Henneberg (2) nach Beobachtungen an lagernder Hefe angegeben. Es handelt sich in diesem Falle jedoch nicht um einen Austritt derselben aus den Vakuolen, sondern offenbar um einen allmählichen Verbrauch durch die Zelle. Umgekehrt können allerdings, wie schon früher mitgeteilt, aus dem Plasma stammende 40 Körperchen in die Vakuole eingeschlossen werden, und ist es durchaus nicht unmöglich, daß nicht nur durch Verschmelzung von Vakuolen ein Eintritt von Resten des Plasmas und dessen Einschlüsse in diese erfolgt, sondern daß auch unter Umständen eine direkte Einwanderung durch die Vakuolenhaut in die Vakuole erfolgt. Nach E. Küster (1) kann 45 man diese Einwanderung dadurch in Gang setzen, daß man die Hefenzellen auf einer Unterlage austrocknen läßt.

Die in den Vakuolen eingeschlossenen Granula repräsentieren, wie dies aus den Andeutungen über ihren Ursprung hervorgeht, noch viel weniger einen einheitlichen Typus als die im Zellplasma zerstreuten. 50 Küster (1) hat festgestellt, daß diese zwei Arten von Körperchen einige Unterschiede in ihrem Verhalten gegen Farbstoffe erkennen lassen. In

dieser Frage zu einer entscheidenden Feststellung vorzudringen, ist jedoch weder ihm noch später auch SYMMERS (1) gelungen. Nach meinen eigenen Beobachtungen speichern sie bald Farbstoffe auf, bald nicht; ebenso verhalten sie sich gegenüber Jodjodkaliumlösung. Tritt in diesem 5 Falle eine Färbung ein, so kann sie nur gelb bis gelbbraun sein, also nur Eiweißkörper anzeigen; zuweilen tritt jedoch auch die charakteristische rotbraune Färbung des Glycogens auf. Die Reaktion mit Osmiumsäure kann ebensowohl fehlen, wie sie mit großer Intensität auftritt. Zuweilen zeigen die Granula in den Vakuolen nach der Behand- 10 lung mit Alkohol und Aether den gleichen Aufbau wie die im Cytoplasma zerstreuten Oelkörperchen.

Ueber die Rolle, welche die Granula im Leben der Zelle spielen, herrscht noch keine Uebereinstimmung. Eine experimentelle Grundlage, welche die eine oder die andere Anschauung stützen könnte, ist nicht 15 gegeben, und es erscheint auch ungemein schwierig, eine solche zu erlangen. Bis jetzt ist auch kaum der Versuch gemacht worden, systematisch ihrer Entstehung nachzugehen und wenigstens in den Hauptzügen festzulegen. Daher ist es auch noch nicht möglich, ein bestimmtes Urteil über die Bedeutung derselben für den Haushalt der 20 Zelle zu gewinnen.

Wie aus den früheren Erörterungen hervorgeht, muß die eine Gruppe derselben, welche beim allmählichen Zerfall des Zellplasmas sich einstellt und welcher, soweit wir unterrichtet sind, die Grundsubstanz eiweißartiger Natur abgeht, von den übrigen getrennt werden. Möglicher- 25 weise kommt einer anderen Gruppe, den Oeltröpfchen die Bedeutung von Sekreten und Exkreten des normalen Stoffwechsels zu. Manches hat die Anschauung für sich, daß die Granula Reservestoffe sind. Wenn wir von anderen Autoren absehen, vertritt diese Anschauung in der letzten Zeit besonders nachdrücklich A. GUILLIERMOND (4). Ihre Gegen- 30 wart in wachsenden Pilzfäden, ihr reichliches Vorkommen in den Fruktifikationsorganen der Pilze, bei den Hefen in den Dauerzellen von WILL und in den Reservezellen, deren Bildung W. HENNEBERG (2) bei lagernder feuchter Hefe annimmt, ihr Verbrauch im Epiplasma der Ascomyceten und der Hefen, in welchem sich übrigens ein deutlicher 35 Unterschied zwischen den metachromatischen Körnchen und den Oeltröpfchen geltend macht, die Erscheinungen der Auflösung bei der Hefe vor der Sporenbildung und bei der Keimung der Dauerzellen, sind sicher Momente, welche dieser Anschauung eine gewisse Unterlage geben. Auf der anderen Seite lassen zahlreiche Beobachtungen den Gedanken 40 nicht abweisen, daß sie in genetischer Beziehung zum Glycogen stehen. Wie schon früher bemerkt, treten stark lichtbrechende Körperchen in der Regel in reichlicher Zahl und zwar fortschreitend in demselben Maße auf, als die Zellen infolge lebhafter Atmung und Selbstgärung das aufgespeicherte Glycogen verbrauchen. Dieses gegenteilige Verhältnis 45 kann Schritt für Schritt verfolgt werden. Ueber die Beschaffenheit der hierbei auftretenden Granula und über einen etwaigen Unterschied gegenüber den sicher den oben beschriebenen anatomischen Aufbau aufweisenden Granula sind kaum noch Untersuchungen angestellt worden. Nicht selten gewinnt man den Eindruck, als ob die ersten Anfänge der Granula 50 (denn sie wachsen und differenzieren sich in der Tat mit zunehmendem Alter der Zelle) mit den zerstreut im Zellplasma auftretenden Bildungsherden des Glycogens zusammenfielen, und daß von hier aus die Ausbreitung des Glycogens im Zellplasma stattfinde.

Sehr beachtenswert für die Deutung der Granula, wenigstens einer Gruppe derselben mit einer Grundlage eiweißartiger Natur, ist jedenfalls die Tatsache, daß bei allen wesentlich in Form von Häuten auf der Kulturflüssigkeit wachsenden Saccharomyceten, wie beispielsweise *S. anomalus*, sowie bei den zu den Gruppen *Mycoderma* und *Torula* gehörigen Pilzformen große Oelkörperchen, wenn auch nur in beschränkter Zahl in so scharf ausgeprägter Weise vorhanden sind. Bekanntlich bilden dieselben einen sehr charakteristischen Bestandteil des Zellinhaltes. Auffällig ist es ferner, daß die Hautgenerationen, also ebenfalls die auf der Oberfläche der Flüssigkeit sich entwickelnden Zellelemente der im übrigen innerhalb derselben wachsenden Arten, insbesondere bei den Bierhefen, meist ungemein reich an Oelkörperchen sind. Die gleichen Beobachtungen ergaben sich für die Zellen der Rindenschichte (also der Oberflächenschichte der Riesenkolonien auf festen Nährsubstraten, welche mit der auf der Flüssigkeitsoberfläche sich entwickelnden Haut identisch sind. Hierzu kommt noch, daß sich die Granula der Hautzellen und der Rindenschichte, wenigstens bei den Saccharomyceten, mikrochemisch anders verhalten als diejenigen der Bodensatzhefe. Alle diese Beobachtungen drängen aber nach der gleichen Richtung, nämlich der, daß die Oelkörperchen in diesem Falle zu der Atmung in Beziehung stehen.

Wie dem auch sein mag, so sprechen schon jetzt eine Reihe von Momenten dafür, daß in den Oelkörperchen wahrscheinlich ein für das Leben der Zelle wichtiges Organ vorliegt. Die Zukunft muß lehren, ob sie einer der bei den höheren Pflanzen im Plasmakörper bekannten Gruppe von Einschlüssen angegliedert werden können.

Manchmal sind es, wie schon bemerkt, sichtlich die Granula, welche unter allen Bestandteilen der Hefenzellen am längsten dem Zerfalle trotzen, so daß sie dann, wenn die Zellmembran schon verquollen ist und die anderen Teile des Zellinhaltes schon verschwunden sind, allein noch übrig bleiben und nun als frei gewordene, staubfeine Kügelchen in der Nährlösung schweben und sie unter Umständen trübe machen. In solchem Sinne werden wohl die Beobachtungen zu deuten sein, welche J. Wortmann (1) an Weinen, die in der Flasche beim Lagern trüb geworden waren, anzustellen Gelegenheit gehabt hat.

Literatur

zum Kapitel Anatomie der Hefenzelle.

*__Albert,__ R. u. W., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1901, Bd. 7, S. 737. *__Barker,__ B. F., (1) Proc. Royal Soc., 1901, Bd. 58, S. 345. — (2) Ann. of botany, 1901, Bd. 15, S. 759. *__Becker,__ C., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1899, Bd. 22, S. 597. *__Beijerinck,__ M. W., (1) Centralbl. f. Bakt., 1894, Bd. 16, S. 49. *__Bouin,__ (1) Arch. d'anatom. microscop., 1898, Bd. 1, S. 435. *__Brücke,__ E., (1) Sitzungsber. d. K. Akad. d. Wissensch. in Wien, Mathem.-naturw. Kl., 1861, Bd. 34, Abt. 2, S. 381. *__Buscalioni,__ L., (1) Malpighia, 1896, Bd. 10, S. 281. *__Casagrandi,__ O., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1897, Bd. 3, S. 563. — (2) Ebenda, S. 634. *__Curtis,__ (1) Ann. Pasteur, 1896, Bd. 10, S. 449. *__Dangeard,__ P. A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1893, Bd 117, S. 68. *__Eisenschitz,__ Siddy, (1) Beiträge z. Morphologie d. Sproßpilze, Dissert. Bern, Wien 1895. — (2) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1895, Bd. 1, S. 674. *__Ernst,__ Paul, (1) Z. f. Hyg., 1889, Bd. 5, S. 428. — (2) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 1. *__Feinberg,__ L., (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1902, S. 567. *__Fischer,__ Alfr., (1) Untersuchungen über den Bau der Cyanophyceen und Bakterien, Jena 1897, S. 11. *__Fischer,__ Bernhard, (1) Centralbl. f. Bakt., 1893, Bd. 14, S. 653. *__Guilliermond,__ Alexander, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1901, Bd. 132, S. 175. — (2) Ebenda, S. 1194. — (3) Ebenda, 1901, Bd. 133, S. 242. — (4) Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures à forme levure, Lyon 1902. — (5) Annales mycologici, 1904, Bd. 2, S. 184. *__Hansen,__ Emil Chr., (1) Bot. Centralbl., 1885, Bd. 21, S. 181. — (2) Comptes rendus de Carlsberg, 1886, Bd. 2, S. 106. — (3) Ebenda, S. 125; Z. f. d. ges. Brauwesen, 1886, Bd. 9, S. 374.

*Henneberg, W., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1902, Bd. 25, S. 378. — (2) W. f. Brauerei, 1904, Bd. 21, S. 260. — (3) Ebenda, S. 347; Z. f. Spiritusindustrie, 1904, Bd. 27, S. 96. — (4) W. f. Brauerei, 1904, Bd. 21, S. 563. — (5) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 13, S. 150. *Hieronymus, Georg, (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1893, Bd. 11, S. 176. *Hirschbruch, Albert, (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 9, S. 465 u. 737. *Hoffmeister, Camil, (1) Sitzungsber. d. Deutsch. naturw. Vereins f. Böhmen „Lotos" in Prag, 1900; Z. f. d. ges. Brauwesen, 1902, Bd. 25, S. 225. *Janssens, Fr. A., (1) Centralbl. f. Bakt., 1893, Bd. 13, S. 639. — (2) La Cellule, 1903, Bd. 20, S. 337. *Janssens, Fr. A., und Leblanc, A., (1) La Cellule, 1898, Bd. 14, S. 203. *Janssens, Fr. A., und Mertens, A., (1) La Cellule, 1903, Bd. 20, S. 351. *Klöcker, Albert, (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1895, Bd. 4, S. 20. *Krasser, Fridolin, (1) Oesterr. bot. Zeitschr., 1893, Bd. 43, S. 14. *Küster, Ernst, (1) Biolog. Centralbl., 1898, Bd. 18, S. 305. *Kunstler, J., und Busquet, M. P., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1897, Bd. 125, S. 967. *Laurent, Émile, (1) Ann. Soc. belge de Microscopie, 1890, Bd. 14, S. 29. *Liebermann, Leo, und Bittó, Bela von, (1) Centralbl. f. Physiol., 1894, Bd. 7, S. 857. *Lindner, Paul, (1) Mikroskopische Betriebskontrolle, 1. Aufl., Berlin, 1895, S. 222. — (2) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1896, Bd. 2, S. 537. *Macallum, (1) Quat. Journ. of microsc. science, 1895, Bd. 38, S. 175. *Mangin, Louis, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1888, Bd. 107, S. 144. — (2) Ebenda, 1893, Bd. 117, S. 816. *Marpmann, G., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 9, S. 357. *Moeller, H., (1) Centralbl. f. Bakt., 1892, Bd. 12, S. 537. — (2) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1893, Bd. 11, S. 7. — (3) Centralbl. f. Bakt., 1893, Bd. 14, S. 358. *Mulder, G. J., (1) Versuch einer allgemeinen physiologischen Chemie. Deutsche Ausgabe, 1844—1851, Bd. 1, S. 203. *Nägeli, C. von, (1) Nägelis und Schleidens Zeitschr. f. wissenschaftl. Botanik, 1844, Bd. 1, S. 34. — (2) Sitzungsberichte der Bayr. Akad., Mathem.-physik. Kl., 1879, Bd. 9, S. 296. *Nägeli, C. von, und Loew, O., (1) Sitzungsberichte der Bayr. Akad., Mathem.-physik. Kl., 1878, Bd. 8, S. 161. — (2) Ebenda, 1879, Bd. 9, S. 296. *Nägeli, C. von, und Schwendener, S., (1) Das Mikroskop, 2. Aufl., Leipzig 1877, S. 530. *Raum, Johannes, (1) Z. f. Hyg., 1891, Bd. 10, S. 1. Rayman, Bohuslaw, und Kruis, Karl, (1) Bull. internat. de l'Ac. des Sciences de Bohême, 1903, S. 1. *Salkowski, E., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1894, Bd. 27. S. 3225. *Schander, R., (1) Jahresber. der Vereinigung der Vertreter der angew. Botanik, 1903/04, Bd. 2, S. 85, Anmerkung. *Schiönning, H., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1895, Bd. 4, S. 30. *Schleiden, M. J., (1) Grundzüge d. wissenschaftl. Botanik, 3. Aufl., 1849, Bd. 1, S. 207. *Schlossberger, J. E., (1) Liebigs Ann., 1844, Bd. 51, S. 193. *Schützenberger, P., und Destrem, A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1879, Bd. 88, S. 383. *Schmitz, Friedrich, (1) Verhandl. und Sitzungsber. d. naturhist. Vereins der preußischen Rheinlande und Westfalens, 1879, Bd. 36, S. 362. *Strasburger, E., (1) Das botanische Praktikum, Jena 1884, S. 351. *Symmers, W. St. Clair, (1) Transactions of the British Institute of preventive medicine, London 1898, Bd. 1; Centralbl. f. Bakt., 1. Abt., 1898, Bd. 23, S. 794. *Tanret, C., (1) Bull. Soc. chim. Paris, 1897, Bd. 17, S. 914. *Wager, H., (1) Ann. of botany, 1898, Bd. 12, S. 499; Kochs Jahresber., 1898, Bd. 9, S. 31. *Wegner, R., (1) Vereinszeitschr. f. Rübenzucker-Industr., 1890, Bd. 40, S. 789. *Wiesner, J., (1) Anatomie und Physiologie der Pflanzen, Wien 1890, S. 67. *Will, Hermann, (1) Allgem. Brauer- und Hopfen-Ztg., 1892, Bd. 32, S. 1088. — (2) Z. f. d. ges. Brauw., 1893, Bd. 16, S. 345. — (3) Ebenda, 1895, Bd. 18, S. 286. — (4) Ebenda, 1897, Bd. 20, S. 447. — (5) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 367. — (6) Ebenda, S. 185. — (7) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1900, Bd. 23, S. 185. — (8) Ebenda, 1904, Bd. 27, S. 196. *Wilhelmi, A., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 306. *van Wisselingh, C., (1) Jahrb. wiss. Bot., 1898, Bd. 31, S. 619. *Wortmann, J., (1) Weinbau und Weinhandel, 1899, S. 294, *Wróblewski, A., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1899, Bd. 31, S. 3218. *Zacharias, E., (1) Bot. Ztg., 1887, Bd. 46, S. 281. *Zalewski, A., (1) Osobne odbicie Z. XIII t. Rozpr. i Spr. Wydz. mat.-przyr. Akad. w Krakowie, 1885; Bot. Centralbl., 1886, Bd. 25, S. 2. *Zettnow, (1) Z. f. Hyg., 1899, Bd. 30, S. 1. *Ziemann, H., (1) Centralbl. f. Bakt., 1. Abt., 1898, Bd. 24, S. 945. *Zimmermann, A., (1) Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle, Breslau, 1887, S. 26. — (2) Beihefte z. Bot. Centralbl., 1893, Bd. 3, S. 420.

(Manuskript-Abschluss: 31. Dez. 1904)

Zweiter Abschnitt.

Spezielle Physiologie der Ernährung und der Vermehrung und Methodik der Reinzüchtung der Hefen.

Von Dr. LAFAR.

3. Kapitel.

Mineralische Nährstoffe.

§ 18. Aschengehalt und Aschenanalysen.

Ueber den Aschengehalt der Hefen besitzen wir eine beträchtliche Anzahl von Ermittlungen, von denen etliche im nachstehenden angeführt seien. Es sind Prozente, bezogen auf Trockenrückstand.

Oberhefe:	**7,65**	**2,5**	**8,9**	**5,5**	**11,5**
Analytiker:	MITSCHERLICH	SCHLOSSBERGER	BULL	BĚLOHOUBEK	HESSENLAND (1)

Unterhefe:	**7,51**	**3,5**	**5,3**	**8,1**
Analytiker:	MITSCHERLICH	SCHLOSSBERGER	WAGNER	SCHÜTZENBERGER u. DESTREM

8,07	**7,61**	**8,76**	**7,7**	**10,1**
LINTNER, München	LINTNER, Weihenstephan	SEYFFERT, Petersburg	BÉCHAMP	HESSENLAND

Die Zuverlässigkeit dieser Angaben ist nicht in allen Fällen gleich groß. So finden z. B. die auffallend niederen Zahlen, welche LIEBIG's Schüler J. SCHLOSSBERGER (1) angibt, darin ihre Erklärung, daß dieser Chemiker seine Hefenproben vor dem Eintrocknen und Einäschern recht sauber mit viel Wasser und auch noch mit Aether „gereinigt" und dadurch auch aschenhaltige Bestandteile der Zellen ausgelaugt und entfernt hat. Viel schwerer noch als derlei methodologische Fehler, welche bei wachsender Einsicht in die Natur der Aufgabe nach und nach vermieden wurden, fällt aber ein anderes Moment ins Gewicht, das ist die Beschaffenheit des der Untersuchung unterworfenen Materiales selbst. Dieses bestand fast ausnahmslos in Proben von Betriebshefe aus der Brauerei oder von käuflicher Preßhefe. Nun wissen wir aber heute, daß die in der untergärigen Brauerei nach Beendigung der Hauptgärung am Grunde des Jungbieres angesammelte Hefenernte (die „Satzhefe") nicht aus Hefenzellen allein besteht, sondern eine nicht geringe Anzahl von anderen Substanzen einschließt, so insbesondere aschenhaltige

Eiweißstoffe, welche während der Gärung aus der Würze ausgefallen oder von den Zellen ausgeschieden worden und zu Boden gesunken sind, dann Kristalle von oxalsaurem Kalk usw. Aehnliches gilt für die Hefe der obergärigen Brauereien, wie auch für die Preßhefe und für die am Grunde des werdenden Jungweines sich ausscheidende Hefe, den sog. Trub. Es war demnach das Material, auf welches die zuvor angeführten Zahlen fast ausnahmslos sich beziehen, durchaus nicht einheitlicher Natur. Jene Zahlen geben also, insoweit sie auf einem in chemisch-analytischer Hinsicht einwandfreien Wege erhalten wurden, zwar ein richtiges Bild von dem Aschengehalt von Brauerei-Satzhefe und von käuflicher Preßhefe, nicht aber auch einen verläßlichen Anhalt zur Beurteilung des Aschengehaltes der Hefenzellen selbst. Es ist also in diesem Punkte so gut wie alles erst noch zu tun. Betont muß es jedoch, auch in Hinblick auf spätere Erörterungen, schon an dieser Stelle werden, daß Hefenasche und Satzhefenasche zwei voneinander sehr verschiedene Dinge sind.

Die eben erhobenen Bedenken gelten nun aber auch für jene Angaben, welche die prozentische Zusammensetzung derartiger Aschen betreffen. Aus diesem Grunde müssen die den Reigen der Hefenaschen-Analysen führenden ersten Befunde von Braconnot über die Zusammensetzung einer Weinhefe darauf verzichten, hier wiedergegeben zu werden. Und nur unter ausdrücklichem Hinweis auf ihre bedingte Zuverlässigkeit haben in der nachstehenden Tabelle jene Analysenergebnisse Aufnahme gefunden, welche von Champion und Pellet und von A. Bělohoubek (1) veröffentlicht worden sind und auf käufliche Preßhefe sich beziehen, die ja meist einen beträchtlichen Zusatz von (aschenhaltigem) Stärkemehl einschließt, und zwar betrug er in den in Rede stehenden Fällen 10 und 14 Proz.

Prozentische Zusammensetzung von Hefenaschen.

	Preßhefe			Weißbier-Oberhefe	Unterhefe					Münchner Unterhefe	Weihenstephaner Unterhefe
	Mitscherlich	Bělohoubek	Champion u. Pellet	Bull	Liebig	Liebig	Mitscherlich	Béchamp	Béchamp	Lintner	Lintner
K_2O	39,5	38,68	23,33	35,2	29,1	30,6	28,3	28,79	31,52	38,45	26,07
Na_2O	—	1,82	16,63	0,5	2,5	—	—	1,93	0,77	—	2,26
CaO	1,0	1,99	1,36	4,5	2,4	2,1	4,3	2,49	2,39	2,85	7,58
MgO	6,1	4,16	5,23	4,1	4,1	4,2	8,1	6,54	3,77	5,80	6,34
Fe_2O_3	—	[1]) 0,06	[1])	0,6	—	—	—	[3]) 7,34	[2]) 2,73	0,51	0,70
P_2O_5	53,8	51,09	49,06	54,7	44,8	48,5	59,4	53,87	53,44	48,19	54,31
SO_3	—	0,57	Spur	—	[4]) 2,1	—	—	6,38	5,05	0,62	0,31
SiO_2	Spur	1,60	1,88	—	14,4	—	—	Spur	Spur	1,26	0,92
Cl	—	0,03	Spur	0,1	—	—	—	?	?	—	—
Unbestimmt	—	—	[5]) 2,51	—	—	—	—	—	—	—	—
Summe	100,4	100,00	100,00	99,7	99,4	85,4	100,1	107,34	99,67	97,68	98,49

[1]) Spuren von MnO. [2]) Spuren von Al_2O_3. [3]) Vielleicht ein Druckfehler anstatt richtig 0,34. [4]) inkl. Chlor und CO_2. [5]) inkl. Fe_2O_3.

Greifen wir, um Kritik zu üben, gleich die erste dieser Analysen heraus. Die ausgewiesenen 53,8 Teile Phosphorsäure verlangen zu ihrer vollständigen Sättigung 106,8 Teile Kali, während von diesem nur 39,5 Teile vorhanden sind, welche nicht für mehr als 19,9 Teile P_2O_5 ausreichen. Der unversorgte Rest von 33,9 Teilen P_2O_5 kann durch die 5 noch übrigen Basen, nämlich 1,0 CaO + 6,0 MgO, nicht vollständig gebunden werden, so daß also noch 33,9 — (0,8 + 7,1) = 26,0 Teile P_2O_5 frei bleiben. Auf solchen Ueberschuß an Phosphorsäure ist die saure Reaktion der Hefenasche, bzw. einer wäßrigen Lösung dieser letzteren, zurückzuführen; sie ist, nebenbei gesagt, wohl zuerst durch 10 QUEVENNE (1) bemerkt worden. Dieser Ueberschuß an Phosphorsäure nun, aus organischen Phosphorverbindungen (Nuclein) der Zelle herstammend, treibt, weil feuerbeständig, die Schwefelsäure während des Einäscherns aus. Man wird also von dieser letzteren nur dann etwas in der Asche vorfinden, wenn man durch geeigneten Zusatz von Basen 15 für ihre Bindung vorgesorgt hat. Derartige Vorsicht ist durch BÉCHAMP (1) im Jahre 1871 geübt, hingegen durch MITSCHERLICH (1) im Jahre 1845 und sogar auch noch durch J. VON LIEBIG (1) im Jahre 1870 unterlassen worden, obgleich schon damals bekannt war, daß die Hefe eine nicht unbeträchtliche Menge von Schwefel enthält. LIEBIG selbst hatte von 20 diesem 0,69 Prozent im Trockenrückstand vorgefunden, während MITSCHERLICH, REICHENBACH und DEMPWOLFF 0,6 bzw. 0,57 und 0,39 Proz. angeben.

Auch hinsichtlich der Phosphorsäure bedarf es sorgfältigen Arbeitens, wenn man vermeiden will, daß sie zu Beginn des Veraschens, also 25 während des Verkohlens, zum Teil zu Phosphor reduziert werde, welcher sich verflüchtigt. Diese Möglichkeit ist, wie es scheint, auch bei MITSCHERLICH's Verfahren nicht ausgeschlossen. In betreff der in der sechsten Spalte der Tabelle ausgewiesenen 14,4 Proz. Kieselsäure bleibt es zunächst unentschieden, ob sie ausschließlich nur auf Verunreinigung 30 der Probe u. dgl. zurückzuführen sind.

§ 19. Kalium, Magnesium, Eisen, Phosphor und Schwefel als Nährstoffe. Die Bedeutsamkeit des Kalkes.

Man darf nicht erwarten, über den Aschenbedarf der Hefe schon zu jener Zeit und bei jenen Forschern Annehmbares zu finden, welche der 35 Meinung waren, daß dieses „Ferment" ein in Zersetzung begriffener lebloser Eiweißkörper und nicht mehr sei. Hielt doch sogar QUEVENNE (1), welcher der Hefe den Charakter eines Lebewesens nicht absprach, die Asche der Hefe für etwas Nebensächliches, für eine sozusagen zufällige Verunreinigung. 40

Die Frage nach der Unerläßlichkeit von Mineralstoffen für die Entwicklung der Hefe konnte erst dann entschieden werden, als es gelungen war, eine Nährlösung aufzufinden, in welcher die erforderliche Stickstoffnahrung nicht in Gestalt der (stets aschenhaltigen) Eiweißkörper geboten wurde. Dies hat zuerst PASTEUR (1) im Jahre 1860 mit Erfolg 45 versucht. Zur Deckung des Aschenbedarfes für die Zwecke der künstlichen Züchtung im Laboratorium schlug er die Asche von Bierhefe vor. An der von ihm angegebenen Nährlösung, welche aus 100 ccm Wasser, 10 g Rohrzucker, 0,1 g weinsaurem Ammon und der Asche von 1 g Hefe (also 0,07—0,08 g) besteht, hat NÄGELI (1) später ausgesetzt, daß 50

sie ungefähr siebenmal so viel Asche führe, als im Verhältnis zur Größe der gebotenen Stickstoffquelle erforderlich wäre.

Die weitere Frage nach Anzahl und Art der unentbehrlichen anorganischen Nährstoffe war von Pasteur nicht weiter verfolgt worden. Dies geschah erst im Jahre 1869 durch Adolf Mayer (1), welcher durch mannigfaltige Züchtungsversuche zu dem Schlusse gelangte, daß von mineralischen Nährstoffen für die Entwicklung der Hefe *unentbehrlich und hinreichend* sind: *Kalium, Magnesium, Eisen, Phosphor* und *Schwefel*. — Diese Befunde sind nicht an Reinzuchten gewonnen worden, die man damals noch gar nicht herzustellen vermochte, sondern an Hefenzuchten, welche mit anderen fremden Organismen verunreinigt waren. Diese letzteren aber konnten das Ergebnis in sehr irreführender Weise mitbestimmen; der § 22 des nächsten Kapitels wird dies im Falle der Versorgung mit Stickstoffnahrung gerade an Mayer's Arbeit dartun.

In betreff des **Kaliums** liegen Versuche an Reinzuchten vor, welche zur Feststellung geführt haben, daß dieses Metall ein unentbehrlicher Nährstoff ist; nähere Angaben hierüber sind schon auf S. 387—388 des I. Bandes gemacht worden. Den Beobachtungen von Matthews (1) zufolge soll dieses Element durch die Hefe leichter assimiliert werden, wenn es nicht ausschließlich als Phosphat sondern zum Teil auch als Sulfat vorhanden ist; man vergleiche darüber auch das bei Ad. Mayer (1) Gesagte. H. Becker (1) behauptet, daß die Größe des Kaligehaltes der Würze von Einfluß auf den Vergärungsgrad des Bieres ist (s. 6. Kap. d. V. Bds.). Eine Bierwürze, welche (ohne künstlichen Zusatz) 0,071 Proz. Kalium (K) enthielt, vergor auf 56,4 Proz. Zwei Vergleichsproben, deren Kaliumgehalt man durch Zugabe von Kaliumkarbonat auf eine Höhe von 0,078 bzw. 0,085 Proz. K gebracht hatte, zeigten dann unter sonst gleichen Bedingungen einen Vergärungsgrad von 52,2 bzw. 48,9 Proz. Es hat also die Erhöhung des Kaliumgehaltes eine Abnahme des Vergärungsgrades im Gefolge gehabt. In den durch R. Kusserow (1) mit Dikaliumphosphat (K_2HPO_4) an Würzen angestellten Versuchen, durch welche ein Zusatz dieses Salzes ohne merklichen Einfluß auf die Gärung befunden wurde, konnte die Wirkung des Kaliums allein nicht beurteilt werden, weil sie durch diejenige der Phosphorsäure mitbestimmt wurde.

Ueber das **Magnesium**, als den zweiten unentbehrlichen mineralischen Nährstoff für Hefen, sind gleichfalls schon im Ersten Bande, und zwar auf S. 392—393, Angaben über Befunde an Reinzuchten gemacht worden, so insbesondere auch in betreff der zuerst durch A. Kossowicz (1) bemerkten Hervorrufung von Farbstoffbildung bei einigen Saccharomyceten.

Auch über die Rolle des **Eisens** im Stoffwechsel der Hefe ist das Wichtigste schon im Ersten Bande, und zwar in dessen § 84 auf S. 398, gesagt worden.

Der Bedarf an **Phosphorsäure**, die ja einen wichtigen Baustein für die Nucleinsäure abgibt (s. Bd. I, S. 248), ist bei den Hefen sehr groß. Sie enthalten von jener recht ansehnliche Mengen. In Uebereinstimmung mit den Angaben der Tabelle auf S. 84 stehen die von C. Lintner (1) aus der Münchner Station für Brauerei berichteten (neun) Befunde, welche, auf Trockenrückstand bezogen, zwischen den Grenzen von 3,21 und 3,84 Proz. sich halten und 3,61 Proz. als Mittelwert ergaben. Uebertroffen werden alle diese noch von den in der Asche einer englischen obergärigen Bierhefe durch Salomon und Mathew (1) festgestellten 59,5 Proz. P_2O_5, bezogen auf Asche selbst. In der Brauerei wird der

Bedarf der Hefe an Phosphorsäure unter gewöhnlichen Verhältnissen genügend durch die im Malze vorhandenen Phosphorverbindungen gedeckt. Es kommen jedoch Fälle vor, in welchen jenes sich als daran nicht ausreichend ergiebig erweist, so daß dann Störungen eintreten können, welche in ungenügender Vergärung der Würze und zu geringer Gärkraft der entstehenden Satzhefe sich äußern. C. LINTNER (1) hat über einen solchen Fall aus einer untergärigen Brauerei berichtet. Auch in den britischen (obergärigen) Brauereien bleibt ab und zu infolge Armut der Würzen an Phosphorsäure der Vergärungsgrad hinter dem üblichen zurück. Man hilft sich dort durch Zusetzen von Phosphaten, insbesondere von Kaliumphosphat, zur Würze. Jedoch muß man dabei sich hüten, des Guten zu viel zu tun; denn es scheint aus den von SALOMON und MATHEW angestellten Beobachtungen hervorzugehen, daß die Anwesenheit einer zu großen Menge von Phosphaten auf die Gärung verzögernd einwirkt. Bei der Bereitung des Metes aus dem an Phosphaten sehr armen Honig erweist sich ein künstlicher Zusatz an solchen Salzen als sehr nützlich; Näheres darüber im 17. Kapitel des V. Bandes. Die Vermutung ELION's (1), daß der Bedarf an Phosphorsäure und die Größe der durch sie ermöglichten Steigerung der Gärtätigkeit bei verschiedenen Hefenstämmen unter sonst gleichen Bedingungen verschieden groß ist, muß erst noch experimentell genauer geprüft werden.

Die Bedeutsamkeit des **Schwefels** für den Stoffwechsel der Hefe liegt noch ganz im Dunkel. Die Tatsache, daß dieses Element noch in keiner Hefenprobe vermißt worden ist, sofern man zu suchen verstanden hatte, würde die Folgerung zulassen, daß es für den Stoffwechsel auch dieses Pilzes unentbehrlich ist. Die Erbringung des Beweises für die Richtigkeit dieser Annahme auf geradem Wege, also durch Züchtungsversuche, ist fast unmöglich, weil es (wenigstens bisher) nicht hat gelingen wollen, den für die Erzielung einer auch nur einigermaßen größeren und für Analysenzwecke ausreichenden Erntemenge erforderlichen Zucker von den ihm hartnäckig anhaftenden schwefelhaltigen Verunreinigungen (s. Bd. I, S. 399) zu befreien. Ungenügend beantwortet ist auch die Frage nach der Art der aufnehmbaren Verbindungen. Es scheint, daß die bei den höheren Pflanzen so beliebten Sulfate (des Calciums und des Magnesiums) für die Zwecke des Aufbaues der Hefenzelle wenig geeignet sind. Aus diesen Salzen kann der Schwefel unter Umständen, anstatt assimiliert zu werden, in Gestalt von schwefliger Säure oder sogar von Schwefelwasserstoff abgespalten und ausgestoßen werden; nähere Angaben darüber wird das 20. Kapitel bringen.

Daß das **Calcium** für den Aufbau der Hefenzellen wahrscheinlich entbehrlich ist, wurde schon auf S. 392 und 393 des I. Bandes bemerkt. Damit sollte aber nicht auch zugleich gesagt sein, daß es für die praktische Verwendbarkeit und Wirksamkeit der Hefen gleichgültig ist, ob in den durch diese letzteren zu vergärenden Flüssigkeiten Kalk vorhanden ist, und wieviel davon. Es ist im Gegenteil eine alte und allgemeine Erfahrung der Gärungstechniker, daß kalkarme Bierwürzen und Spiritusmaischen eine sehr schlechte Vergärung zeigen und daß man solchem Uebel durch Kalkzufuhr abhelfen und vorbeugen kann. Durch Versuche an Reinzuchten des *Sacch. cerevisiae I* HANSEN hat KOSSOWICZ (2) gezeigt, daß in 100 ccm einer mit 0,01 Proz. Calciumchlorid versetzten Mineralsalz-Nährlösung eine Aussaat von 10000 Zellen eine Ernte von 320 Millionen Zellen lieferte, während in einer im übrigen gleichen, aber kalkfreien Nähr-

lösung nur 226 Millionen Zellen heranwuchsen. Aber auch der Verlauf und das Ergebnis der Gärung waren im ersteren Falle viel befriedigender. Ueber die Art dieses förderlichen Einflusses des Kalkes wissen wir nichts Näheres; vielleicht besteht sie in der Bindung der auch im Stoffwechsel der Hefe reichlich auftretenden Oxalsäure (s. Bd. I, S. 317). Jedenfalls aber werden wir die Behauptung von der Entbehrlichkeit des Calciums für die Hefen dahin einschränken müssen, daß man, sobald es sich nicht mehr um den Zellaufbau allein sondern auch um den Stoffwechsel und die Gärtätigkeit handelt, dieses Element als einen unerläßlichen Hilfsstoff gelten läßt. Die Erfahrung der Brauer geht dahin, daß eine Hefe, welche in kalkarmer Würze tätig sein muß, rasch entartet, insbesondere bald keinen Bruch mehr gibt (s. 6. Kap. d. V. Bds.). Unter jener Mißlichkeit leiden solche Brauereien, welche mit einem sehr weichen (also kalkarmen) Wasser zu arbeiten gezwungen sind. Es ist dort ein alter Kunstgriff, diesem Mangel dadurch abzuhelfen, daß man dem Maischwasser ein paar Löffelvoll gepulverten ungebrannten Gipses zusetzt. H. Seyffert (1) berichtet über einen solchen Fall aus einer Petersburger Brauerei, deren Wasser in 100000 Teilen nur 1,3 Teile CaO aufweist. Dort konnte man mit einer Reihe von Reinhefenstämmen, die aus Deutschland bezogen worden waren, durchaus nicht eine befriedigende Bottichgärung erreichen. Als Ursache ergab sich schließlich der geringe Gehalt der Würzen an Kalk, an welchem die Hefen nach und nach verarmten, und nach welchem sie dadurch so hungrig wurden, daß sie selbst jene kleinen Mengen an sich zogen, welche das Wasser bieten konnte, in dem sie gewaschen wurden. Die nachstehende Tabelle veranschaulicht dies sehr deutlich.

Analysen-Material:	Aschengehalt des Trockenrückstandes	Prozentische Zusammensetzung der Asche									
		K_2O	Na_2O	CaO	MgO	Fe_2O_3	CuO	P_2O_5	SO_3	SiO_2	Cl
Bayrische Würze nach Lintner		41,20	0,03	**4,50**	2,20	—	—	31,50	Spur	20,40	Spur
Petersburg. helle Würze nach Seyffert	0,24	32,99	1,60	**1,63**	9,21	0,44	—	45,78	0,32	6,88	0,10
Hefe **A**:											
1. eben aus Deutschland bezogen	9,71	32,66	0,59	**4,48**	4,94	0,05	—	55,75	Spur	0,51	0,11
2. nach 7 Gängen im Betrieb	8,94	35,22	—	**0,54**	5,23	0,45	—	56,75	Spur	1,22	Spur
3. Reinzucht, schwach gewässert	7,56	34,92	—	**0,83**	5,25	0,29	0,64	56,86	Spur	0,80	Spur
4. dgl., stark gewässert	7,65	31,87	0,07	**1,48**	5,47	0,42	0,37	58,88	Spur	0,98	Spur
Hefe **B**:											
1. Reinzucht, das erste Mal im Betrieb gewesen in gegipster Würze; etwas gewässert	6,82	31,76	Spur	**3,68**	5,38	0,15	0,27	57,67	Spur	0,62	Spur
2. Nach zwei Gängen in nicht gegipster Würze; stark gewässert	5,01	29,06	0,14	**2,42**	5,70	1,21	0,38	60,30	Spur	1,21	Spur

Seyffert hat seine Beweisführung dadurch verschärft, daß er vermittelst Dialyse diesen niedrigen Kalkgehalt der Würzen noch weiter künstlich verringerte und diese nun mit Hefe anstellte: es trat dann Blasengärung ein (s. 6. Kap. d. V. Bds.). Seine Feststellungen sind auch für die Frage nach der Einführung von Reinhefe in den praktischen Betrieb von Wichtigkeit; denn sie zeigen, daß es zur Erzielung eines befriedigenden Erfolges nicht bloß der glücklichen Wahl eines geeigneten Hefenstammes sondern auch einer für diesen letzteren günstigen Zusammensetzung des Nährbodens bedarf, in welchem er tätig sein soll.

Der **Einfluß der Größe des Gehaltes an Salzen** in dem Nährboden auf die Hefenzellen und deren Wirksamkeit ist nicht bloß von physiologischem Interesse sondern auch von praktischer Bedeutsamkeit für einige Zweige der Gärungstechnik, insbesondere für die Melassenbrennerei (s. 10. Kap. d. V. Bds.). Für die Züchtung im Laboratorium wählt man, abgesehen von den Fällen besonderer Untersuchungsaufgaben, bei Verwendung einer aus Mineralsalzen bereiteten Nährlösung die günstigste Konzentration, so daß also für gewöhnlich von jenen insgesamt nicht viel mehr als 1 g im Liter vorhanden ist. In den zu vergärenden Maischen der Melassenbrennereien hingegen findet die Hefe 20—25 g Salze vor, und zwar zum allergrößten Teile solche des Kaliums. Die Gärführung ist hier also schon aus diesem Grunde eine sehr heikle Aufgabe: Störungen, insbesondere vorzeitiges Degenerieren der unter hohem osmotischen Druck arbeitenden Hefe, sind nichts Seltenes. Ein genaueres Studium des Einflusses hoher Konzentrationen von Salzen würde also für die Technik von Nutzen werden können. Bisher liegen jedoch darüber nur spärliche Beobachtungen vor, von denen einige schon auf S. 336 und 347 des I. Bandes angeführt sind, während andere, betreffend die Beeinflussung der Zellgröße, hier folgen. Diese letztere sah E. Laurent (1) bei steigender Konzentration (bis 30 Proz. Kalisalpeter) abnehmen. Nach Clerfeyt (1) kann aber unter Umständen auch das Gegenteil eintreten. A. Kossowicz (1) hat letzterem beistimmen können: insbesondere das Magnesiumsulfat begünstigt auffallend das Größerwerden der Zellen, aber auch ein stärkerer Gehalt an Chlorkalium (12 Proz.) wirkt im gleichen Sinne. L. Lepoutre (1) zufolge soll die Höhe der Vergärung in Bierwürzen mit künstlich gesteigertem Salzgehalt geringer ausfallen, und zwar sogar auch dann, wenn darin solche Hefen tätig sind, welche an starke Salzlösungen gewöhnt worden waren. Vandevelde (1 u. 2) konnte als Folge eines Zusatzes verschiedener Salze, und zwar bis zu einem Zehntel des Molekulargewichtes in Grammen auf ein Liter, zunächst zwar eine schwache Verzögerung der Gärung bemerken, später aber erwies sich in solchen Proben gleich viel Zucker vergoren wie in den Vergleichszuchten ohne solchen Salzzusatz. Yabe (1) zufolge wird eine bei der Sakebereitung (s. 9. Kap. d. V. Bds.) mitspielende Hefe durch 6 Proz. Kochsalz im Nährboden nicht in ihrer Gärwirkung behindert.

Literatur

zum Kapitel Mineralische Nährstoffe.

*Béchamp, A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1871, Bd. 73, S. 337. ***Becker,** H., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1897, Bd. 20, S. 437. ***Bělohoubek,** A., (1) Studien über Preßhefe. Prag 1876. ***Clerfeyt,** Ch., (1) Bullet. Acad. Roy. Belgique. Classe des Sciences, 1901, S. 337. ***Elion,** H., (1) Centralbl. f. Bakt., 1893, Bd. 14, S. 53. ***Hessenland,** Fr., (1) Zeitschr. d. Ver. f. d. Rübenzucker-Industrie d. Deutschen Reichs, 1892, Bd. 42, S. 671. ***Kossowicz,** Alex., (1) Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen Oester-

reichs, 1903, Bd. 6, S. 27. — (2) Ebenda, S. 731. *Kusserow, R., (1) Brennerei-Ztg., 1897, Bd. 14, Nr. 318. *Laurent, Em., (1) Ann. Soc. belge de Microscopie, 1890, Bd. 14, S. 29. *Lepoutre, L., (1) Bullet. Acad. Roy. Belgique, 1902, S. 155. *Liebig, J. von, (1) Liebigs Ann., 1870, Bd. 153, S. 1. *Lintner, C., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1883, Bd. 6, S. 397. *Lintner, C. J., (1) Handbuch d. landw. Gewerbe. Berlin 1893. *Matthews, Ch. G., (1) J. federated Inst. Brewing, 1897, Bd. 3, S. 369. *Mayer, Adolf, (1) Untersuchungen ü. d. alkohol. Gärung, d. Stoffbedarf u. d. Stoffwechsel d. Hefepflanze. Heidelberg 1869; Poggendorffs Ann., 1871, Bd. 142, S. 293. *Mitscherlich, E., (1 Monatsberichte d. Kgl. Akad. d. Wiss. zu Berlin, 1845, S. 236. *Nägeli, C. von, (1) Sitzungsber. d. Bayr. Akad. d. Wiss., mathem.-physik. Kl., 1879, Bd. 9, S. 458. *Pasteur, L., (1) Ann. de chim. et de phys., 1860, 3. sér., Bd. 58, S. 323. *Quevenne, F. A., (1) Journal de pharmacie, 1838, Bd. 24, S. 265 u. 329. *Salomon, A. G., und Mathew, W. de Vere, (1) Brewer's Journal, 1884, S. 149. *Schlossberger, J., (1) Liebigs Ann., 1844, Bd. 51, S. 193. *Seyffert, H., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1896, Bd. 19, S. 318. *Vandevelde, A. J. J., (1) Bullet. Acad. Roy. Belgique, 1902, Bd. 16, S. 374. — (2) Bullet. Assoc. chimistes belges, 1904; ref. in W. f. Brauerei, 1904, Bd. 21, S. 114. *Yabe, K., (1) Bullet. College Agriculture Tokio, 1896, Bd. 2, S. 219.

4. Kapitel.

Organische Nährstoffe.

§ 20. Wassergehalt, Trockenrückstand, spezifisches Gewicht und Elementar-Analysen der Hefen.

5 Der Wassergehalt und also auch die Größe des Trockenrückstandes (Trockensubstanz) der Hefenzellen selbst ist in seiner wahren Größe bisher noch nicht genau bekannt. Was an Zahlenangaben darüber in der Literatur sich findet, stützt sich auf Untersuchungen, welche nicht an den Zellen allein sondern an Proben von Satzhefe der Brauereien 10 oder von Preßhefe angestellt worden sind. Die einen wie die anderen sind aber, wie dem Leser schon bekannt ist, nicht einheitlicher Natur, sondern schließen mancherlei organisierte und nichtorganisierte Beimengungen ein.

Die Größe des Trockenrückstandes der Preßhefe wird 15 selbstverständlich durch den Grad der vorausgegangenen Pressung bestimmt. R. Kusserow (1) hat acht verschiedene, stärkefreie Proben aus dem Handel daraufhin geprüft, wodurch 22,1 Proz. als Geringstbefund, 29,9 Proz. als Höchstbefund und 25,6 Proz. als Durchschnittswert sich ergab. In der Praxis rechnet man gewöhnlich mit der Zahl 26.

20 Das spezifische Gewicht der Zellen von Preßhefe war schon im Jahre 1894 durch P. Guichard (1), freilich nach einem nicht ganz zuverlässigen und wahrscheinlich etwas zu hohe Werte liefernden Verfahren der Suspension der Zellen in Gemischen von Alkohol und Chloroform, zu 1,180 bestimmt worden. Kusserow hat das spezifische Gewicht 25 seiner acht Proben von Preßhefe nach einem anderen, wahrscheinlich etwas zu kleine Zahlen ergebenden, pyknometrischen Verfahren ermittelt. Er wägt genau 10 g Hefe ab, verreibt sie in einer Porzellanschale mit ein wenig destillierten Wassers, spült die Aufschlämmung in ein Pyknometer hinein, füllt mit destilliertem Wasser bis zur Marke auf und wägt. 30 Ist Q das Gewicht des Ganzen und P das Gewicht des mit reinem

Wasser allein befüllten Pyknometers, also der Ueberschuß $Q - P = a$, so berechnet sich das spezifische Gewicht (S) der Preßhefenprobe zu

$$S = 10 : (10 - a)$$

Kusserow hat so 1,1093 als Höchstwert und 1,0821 als Geringstwert gefunden. 5

Das spezifische Gewicht des Trockenrückstandes dieser Proben von Preßhefe hielt sich zwischen den Grenzen 1,580 und 1,491 und ließ 1,509 als Durchschnittswert finden. Unter der (allerdings nicht ganz zutreffenden) Annahme, daß das Volumen der Hefenprobe gleich ist der Summe aus den Volumina ihres in Gewichtsprozenten angegebenen 10 Trockenrückstandes (T) und Wassergehaltes (W), kann man, unter Heranziehung jenes Durchschnittswertes für das spezifische Gewicht, nun die Gleichung

$$\frac{W}{1} + \frac{T}{1{,}509} = \frac{100}{S}$$

aufstellen. Für den Trockenrückstand berechnet sich daraus, bei be- 15 kanntem spezifischen Gewichte (S) der Probe, die Formel

$$T = 296{,}5 \cdot \left(1 - \frac{1}{S}\right)$$

und für das spezifische Gewicht der Hefenprobe bei bekanntem Trockenrückstand ergibt sich daraus

$$S = 296{,}5 : (296{,}5 - T).$$ 20

Die quantitativ-analytische Bestimmung des Stärkezusatzes in einer auf diesen hin zu untersuchenden Probe von Preßhefe des Handels auf die eben berichteten Feststellungen zu gründen, ist aus dem Grunde leider untunlich, weil das spezifische Gewicht der wasserfreien Stärke (Amylum) mit seinem Durchschnittswerte von 1,65 nicht weit genug von 25 jenem des Hefen-Trockenrückstandes (1,509) verschieden ist.

Die Elementarzusammensetzung des organischen Teiles des Trockenrückstandes der Hefenzellen wird in ihrem Mengenverhältnis nicht nur durch die Art der Hefe und das Alter der Zellen sondern auch durch die Ernährungsweise bestimmt. Schon im Hinblick auf diese 30 Einflüsse kann man allgemeinen Angaben über jene Zusammensetzung keinen großen Wert zuerkennen. Des weiteren ist aber auch noch zu erwägen, daß die darüber vorliegenden Angaben durch Analysen von Satzhefen und Preßhefen gewonnen worden sind. Haben wir die in solchen Proben niemals fehlenden Beimengungen schon auf S. 84 als 35 ein Hindernis bei der Erzielung zuverlässiger Daten betreffend die Aschenbestandteile der Hefenzellen selbst bezeichnen müssen, so werden unsere Bedenken noch stärker werden, wenn wir den Gehalt der Zellen selbst an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff zu ermitteln versuchen. Je nach dem Grade der Verunreinigung der Probe mit solchen Fremd- 40 körpern (z. B. den Schleimstoffen, s. S. 46) werden also die Ergebnisse der Elementar-Analyse sich zwischen weiten Grenzen bewegen können, obgleich die Zusammensetzung der Zellen selbst sich nicht geändert hat. Nachfolgende Zahlen sind also mit all diesem Vorbehalt gegeben und aufzufassen. 45

Elementarzusammensetzung des organischen Teiles von Hefenproben in Prozenten bezogen auf aschenfreien Trockenrückstand.

Autor	Hefenart	C	H	N	O	S	P
Marcet	Bierhefe	30,5	4,5	7,6		45,4	
Dumas (1)	desgl.	50,6	7,3	15,0		27,1	
Mitscherlich (1)	desgl.	47,0	6,6	10,0	?	0,6	—
Schlossberger (1)	desgl., obergärig	49,8	6,7	12,4	31,1	—	—
Hessenland (1)	desgl., obergärig	48,6	7,1	7,8	36,6	—	—
Derselbe	desgl., untergärig	49,3	8,2	10,5	32,0	—	—

Schon Quevenne (1) hat im Jahre 1838 derlei Analysen für wertlos erklärt, nachdem Marcet die erste veröffentlicht hatte. Dennoch sind später immer wieder solche vorgelegt worden. Ja man hat sogar zu der Meinung sich verstiegen, den Unterschied zwischen Oberhefe und untergäriger Hefe auch in den Ergebnissen der Elementaranalyse ausgedrückt zu finden. Solche Hoffnung ist aber ganz aussichtslos.

Angaben über die einzelnen chemischen Bestandteile, aus denen die Hefen aufgebaut sind, findet der Leser im 11. und 12. Kapitel des I. Bandes. Ergänzungen dazu in betreff des Zellinhaltes wird das 17. Kapitel des vorliegenden Bandes bringen.

Ueber die Abhängigkeit des **Stickstoffgehaltes** der Hefen von den Ernährungsbedingungen sollen sofort hier einige Bemerkungen angeschlossen werden, um die oben ausgedrückte Skepsis gegenüber allgemein gehaltenen und ohne Beifügung näherer Kennzeichnung gemachten Angaben zu rechtfertigen. Es sei zu dem Zwecke aus den Darlegungen des übernächsten Paragraphen die eine Feststellung vorweggenommen, daß Hefenwachstum innerhalb gewisser Grenzen selbst in einem von stickstoffhaltigen Nährstoffen freien, im übrigen aber tauglichen Nährboden dann eintreten kann, wenn die Aussaat reichlich bemessen wird und einen großen Vorrat an jenen Stoffen mitbringt, auf deren Kosten dann eine mäßige Zellvermehrung vor sich gehen kann. So erreichte in einem durch M. Hayduck (1) angestellten derartigen Versuche mit Preßhefe in einer gezuckerten Mineralsalz-Nährlösung die Ernte das Zweieinhalbfache der Anzahl der Zellen der Aussaat. Die Abhängigkeit der Höhe des Stickstoffgehaltes der Hefenernte von dem des Nährbodens ist aber bis heute noch nicht einwandfrei klargelegt. Denn was hierüber an vermeintlichen Feststellungen vorliegt, stützt sich auf die Ergebnisse der Analysen von Satzhefen und ist also, im Hinblick auf die Verunreinigungen dieser mit unlöslichen oder unlöslich gewordenen stickstoffhaltigen Ausscheidungen entweder aus dem Nährboden oder aus den Zellen selbst, wenig zutreffend oder sogar irreführend. Unter solchem Vorbehalt soll also angegeben werden, daß in den durch Hayduck (1) angestellten vergleichenden Versuchen die aus ein und derselben Probe von Spiritushefe beimpften, aber verschiedene Ernährungsbedingungen bietenden Zuchten dann Ernten lieferten, deren Stickstoffgehalt zwischen 3,9 und 10,0 Proz. des Trockenrückstandes befunden wurde. E. Boullanger (1) ermittelte für Bierhefen in ähnlichen Versuchen die Grenzzahlen 5,2 und 9,0 Proz. In betreff des durch Hayduck auf jene Beobachtungen gestützten Verfahrens zur Regenerierung der Brauereihefe durch Stickstoffdiät siehe die Bemerkung im 17. Kapitel. Die Höhe des Stickstoffgehaltes der Ernte wird zufolge P. Thomas (1) und A. L. Stern (2) aber auch durch die Größe des Zuckergehaltes der Nährlösung und zufolge Stern (3) auch durch die Größe des Stickstoffgehaltes der Aussaat

mit bestimmt (s. S. 104). Aus dem zuvor angedeuteten Grunde ist auch nicht ohne etwas Skepsis ein von H. P. Wijsmann (1) erhaltener Befund aufzunehmen, welchem zufolge 10 g Preßhefe mit einem Stickstoffgehalte von 7,5 Proz. des Trockenrückstandes, in einem Liter Malzextrakt-Lösung aufgeschwemmt, zu einer Ernte heranwuchsen, welche nach 25 Minuten 8,3 Proz., nach 50 Minuten 9,5 Proz. und nach 2 Stunden 10,8 Proz. Stickstoff aufwies. Hayduck (1) gibt 7—8 Proz. Stickstoff, auf Trockenrückstand bezogen, als das Gewöhnliche bei Preßhefe an, doch könne der Gehalt an jenem bisweilen auf 5,5 Proz., ja vielleicht auch noch tiefer, hinabgehen. Er werde jedoch dann viel höher befunden, wenn die Zellen in einem an leicht aufnehmbaren Stickstoffbestandteilen reichen, nicht gelüfteten Nährboden gehalten worden sind, in welchem also die eingebrachte Aussaat mehr zur Mästung ihrer selbst als zur Vermehrung angeregt wird. M. Hayduck (2) hat in Proben von derart überfütterten, untergärigen Bierhefen aus der Praxis 9,1—9,9 Proz. Stickstoff, auf Trockenrückstand berechnet, vorgefunden. C. Lintner (2) berichtet, daß in neun Proben von untergäriger Bierhefe der Stickstoffgehalt zwischen den Grenzen von 7,74 Proz. und 8,80 Proz. befunden wurde und einen Mittelwert von 8,38 Proz. ergab. Schließlich sei noch bemerkt, daß die Anreicherung der Bodensatzhefe der Brauerei an stickstoffhaltigen Beimengungen, welche, wie insbesondere die Glutinkörperchen der Würze, durch die auf den Grund der sich klärenden Flüssigkeit (s. 6. Kap. d. V. Bds. niedersinkenden Hefenklümpchen mitgerissen werden, zufolge A. Reichard und A. Riehl (1) auch durch die Größe der Hefengabe mit bestimmt wird.

§ 21. Kohlenstoffquellen.

Die Hefen gehören, soweit bisher bekannt, zu den gegen Kohlenstoff heterotrophen Organismen (s. Bd. I, S. 307). Sie sind also nicht imstande, dieses Element aus der Kohlensäure zu entnehmen, sondern vermögen es nur dann heranzuziehen, wenn es ihnen in tauglicher organischer Bindungsform geboten wird.

Kohlenstoffverbindungen können nun in dreierlei Richtung durch die Hefen verarbeitet werden: 1. durch die Alkoholgärung und andere verwandte Enzymwirkungen, 2. für die auf dem Wege der Atmung zu erreichende Wiedergewinnung aufgebrauchter Spannkraft, 3. für die Neubildung von Zellsubstanz in wachsenden Zellen oder den Ersatz von Bestandteilen, welche in erwachsenen Zellen durch Stoffwechselvorgänge abgebaut und ausgeschieden worden sind. Die erste dieser drei Ursachen des Verbrauches von Kohlenstoffverbindungen wird im Sechsten Abschnitt eingehend erörtert werden. Ueber die zweite wird das folgende (5.) Kapitel einige Angaben bringen. Hier in dem vorliegenden Paragraphen aber betrachten wir die Kohlenstoffverbindungen vom Standpunkte ihrer Bewertung als Baustoffe zur Bildung von Zellbestandteilen.

Wir verdanken insbesondere E. Laurent (1) eine umfassende Prüfung einer beträchtlichen Anzahl von Kohlenstoffverbindungen auf deren Tauglichkeit, den Hefen als Kohlenstoffnahrung dienen zu können. Diese Untersuchungen sind, unter Verwendung von Mineralsalz-Nährlösungen wie auch von Gelatine-Nährboden, an einer Reihe von Bierhefen und Weinhefen in Reinzuchten angestellt worden und haben zu der Feststellung geführt, daß als Kohlenstoffquelle herangezogen und assimi-

liert werden können: die Acetate des Kaliums, Natriums und Ammoniums, die Milchsäure und die Lactate jener drei Basen und des Calciums, die Malonsäure und deren Kaliumsalz, die Bernsteinsäure und deren Ammoniumsalz, das Kalium- und das Calciumsalz der Glycerinsäure, das 5 Calciumsalz der Glycerinphosphorsäure, die Aepfelsäure und deren Kalium- und Ammoniumsalze, die Rechtsweinsäure und deren Kalium- und Ammoniumsalze, die Linksweinsäure, die Citronensäure und deren Kalium- und Ammoniumsalze, die Schleimsäure, die Fumarsäure, die Asparaginsäure, das Asparagin, die Glutaminsäure (alle in einproz. Zusatz), Glycerin, 10 Mannit, Quercit, Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose, Lactose, Dextrin, Salicin, Amygdalin u. a. m. Hingegen wurden von den (als Bodensatzhefe und nicht in Hautzuchten gehaltenen) Hefen nicht assimiliert: Methyl-, Aethyl-, Propyl- und Butylalkohol (2—4 Proz. Zusatz) die Ameisensäure und deren Kalium-, Natrium-, Ammonium- und Calcium- 15 salze, die Essigsäure, die Propionsäure und deren Kaliumsalz, die Buttersäure, Valeriansäure, Stearinsäure, Oelsäure und deren Kaliumsalze, Natriumbutyrat, die Oxalsäure und deren Kalium- und Ammoniumsalze, die Ammoniumsalze der Benzoesäure, Salicylsäure und Gallussäure, Harnstoff (alle als einproz. Zusatz).

20 Wenn die Hefen nicht, wie in Laurent's Versuchen, als Bodensatzzuchten gehalten werden, sondern in Hautzuchten auf der Oberfläche der Nährlösung wachsen, vermögen sie auch Alkohol zu verarbeiten, jedoch wohl hauptsächlich oder sogar ausschließlich nur auf dem Wege der hier außer Betracht bleibenden Atmung, wie schon auf S. 18 bemerkt 25 worden ist. Weitere Angaben über den Abbau organischer Säuren durch Hefen sind auf S. 420 des I. Bandes zu finden; viel rascher und reichlicher werden sie durch Sproßpilze aus der Gruppe der Mycodermen zersetzt, deren Betrachtung dem 14. Kapitel des vorliegenden Bandes vorbehalten ist. In betreff der Mitwirkung der Hefen bei der Säure- 30 abnahme im lagernden Wein sei auf den Fünften Abschnitt des V. Bandes verwiesen.

Die Kohlenhydrate sind in der Natur wie auch in der Praxis der Gärungsgewerbe das gewöhnliche und bevorzugte Material, aus welchem die Hefen ihren Kohlenstoffbedarf decken.

35 Und unter ihnen sind es wieder gewisse **Zuckerarten**, welche da die Hauptrolle spielen. Das Verhalten der Hefen zu diesen ist jedoch, soweit sie eben als Assimilationsmaterial und nicht als Gärmaterial in Betracht kommen, noch nicht genug erforscht. Die Ergebnisse der Laurent'schen Untersuchungen darüber dürfen nicht verallgemeinert 40 werden. Sie gelten nur für die von diesem Forscher geprüften Arten und nicht auch für alle übrigen. Wir verdanken Beijerinck (2) die Feststellung, daß der durch ihn zuerst auf Korinthen aufgefundene *Schizosaccharomyces octosporus* eine Ausnahme von jener Regel Laurent's ist; denn er vermag wohl Maltose, Glucose und Fructose, jedoch nicht 45 auch Saccharose, Lactose, Raffinose, Arabinose, Dulcit, Quercit, Erythrit und Inosit zu assimilieren. Ein Gegenstück zu dieser Art ist der *Saccharomyces Zopfii*, welcher zufolge Artari (1) seinen Kohlenstoffbedarf wohl aus der Saccharose, der Glucose und dem Mannit, jedoch nicht auch aus der Maltose, der Lactose, der Galactose, dem Inulin und dem 50 Melampyrit decken kann. Eine durch Beijerinck (1) aufgefundene und wegen der wohlriechenden Ester, welche sie hervorbringt, als *Saccharomyces fragrans* bezeichnete Hefe verhält sich in dieser Hinsicht gleich der letztgenannten. Der *Sacch. Kefyr* und der *Sacch. acetaethylicus* von

Beijerinck assimilieren Glucose, Fructose, Maltose und Saccharose, und der letztere dieser beiden auch noch Lactose. Ueber die Eignung dieses letztgenannten Disaccharides als Kohlenstoffquelle hat P. Mazé (1) Untersuchungen an elf Stämmen von Hefen aus Weichkäsen angestellt. Aus diesen wenigen Beispielen schon wird man erkennen, daß Ergebnisse von unbedingter Gültigkeit auch in betreff der Assimilation nur bei Verwendung von Reinzuchten erreicht werden können. Der Mangel dieser Voraussetzung ist der Grund, aus welchem sowohl die einschlägigen Versuche C. von Nägeli's (1) aus den Siebziger Jahren wie auch die Veröffentlichungen Th. Bokorny's und noch mancher anderer Experimentatoren hier unverwertet bleiben müssen. Das Dextrin scheint für die meisten Hefen eine gute Kohlenstoffquelle zu sein. In Beijerinck's (1) Versuchen wurde es nur von einer Art abgelehnt.

Die Eignung der **Pentosen** ($C_5H_{10}O_5$) als Kohlenstoffquelle für die Hefen ist von den Gärungsphysiologen bisher noch nicht mit solcher Gründlichkeit geprüft worden, als dies im Interesse der Gärungstechnik zu wünschen wäre. Die Muttersubstanzen jener Zucker, nämlich die Pentosane ($C_5H_8O_4$), finden sich als ein wichtiger Bestandteil pflanzlicher Zellwände auch in den Cerealien reichlich vor, so z. B. zufolge der durch B. Tollens und H. Glaubitz (1) angestellten Ermittlungen in Gerste zu 8,0 Proz., in Malz zu 11,2 Proz., in Weizen zu 8,7 Proz., in Roggen zu 11,1 Proz., in Mais zu 5,8 Proz. der Trockensubstanz. Noch nicht genau geprüft, auch nicht durch die einschlägigen Arbeiten von Cross, Bevan und Cl. Smith (1), ist die Frage, ob und in welchem Verhältnisse die Pentosane der Gerste während deren Keimung hydrolysiert werden; gewiß ist, daß solcher Vorgang bei dem Darren des Malzes sich vollzieht, wobei auch eine je nach den Arbeitsbedingungen verschieden große Menge von Furfurol entsteht. Beim Maischen in der Brauerei dann verbleiben zufolge der obgenannten zwei deutschen Forscher ungefähr drei Viertel des Gehaltes des Malzes an Pentosanen in den Trebern, während ein Viertel in die Würze übergeht, und zwar zum Teil nicht mehr als Pentosane selbst sondern in Gestalt der daraus entstandenen Pentosen. Diese nun sind zwar unvergärbar (s. das 18. Kapitel), können aber wohl als Kohlenstoffquelle für die Hefe dienen, wenn die äußeren Bedingungen danach sind; so z. B. in einigen durch H. van Laer (1) und durch Cross und Bevan (1) angestellten Versuchen. In anderen Fällen wieder werden sie gar nicht oder nur in geringem Maße verarbeitet, wie solches Beijerinck (1) in betreff der Arabinose am *Schizosaccharomyces octosporus* dargetan hat. In noch größerer Menge als in den Bierwürzen werden Pentosen sich in den Maischen jener Rohfrucht-Brennereien vorfinden, welche das Rohmaterial durch mehrstündiges Dämpfen unter Druck (3—4 at) aufschließen.

Kohlenhydrate aus der Gruppe der **Pektine** (s. Bd. III, S. 269—272) scheinen in manchen Fällen, wenn nicht sogar für den Aufbau der Zellen selbst so doch gewiß für einen guten Verlauf der durch diese zu vollziehenden Gärung, unentbehrlich zu sein. Diese den Praktikern bekannte Tatsache ist auch an den Schwierigkeiten mit Schuld, mit denen die Vergärung von Traubenmost und Obstmost durch Reinhefe zu rechnen hat (s. 17. Kap. d. V. Bds.).

Die durch Beijerinck (2) vorgeschlagene, auf das auszeichnende Verhalten gegen die einzelnen Kohlenhydrate gestützte Zerlegung des Genus *Saccharomyces* in die sechs Untergattungen *Glucomyces*, *Maltomyces*,

Lactomyces, Raffinomyces, Polysaccharomyces, Dextrinomyces wird kaum tunlich sein; vgl. darüber das 9. Kapitel des vorliegenden Bandes.

Wenn mehr als eine assimilierbare Substanz als Kohlenstoffquelle im Nährboden vorhanden ist, wird das **Wahlvermögen,** die Elektion, 5 sich geltend machen. Von dieser Erscheinung im allgemeinen wie auch von der Rolle, welche sie im besonderen im Stoffwechsel der Schimmelpilze und der Bakterien spielt, ist schon im § 79 des I. Bandes auf dessen S. 358—362 die Rede gewesen. Bei den Hefen ist deren Studium, sobald es sich um Zuckerarten handelt, aus dem Grunde sehr schwierig 10 und also noch wenig vorgeschritten, weil dabei auch meist die Gärwirkung mit ins Spiel kommt und die sondernde Feststellung der für die Zwecke des Zellaufbaues allein verbrauchten Mengen von Zucker, wenn überhaupt ausführbar, nicht genau genug vorgenommen werden kann. Großen Einfluß auf das Verhältnis der in der Zeiteinheit assimi- 15 lierten Mengen zweier oder mehrerer Nährstoffe nimmt deren Diffusionsvermögen. Dieses wirkt auch dann bestimmend mit, wenn der Hefe zwei oder mehrere gärfähige Zuckerarten zur Verfügung stehen und der Vergärung unterliegen. In dieser letzteren Richtung ist das Wahlvermögen der Hefen schon einer genaueren Prüfung unterzogen worden, 20 deren Ergebnisse jedoch einer Besprechung im 18. Kapitel des vorliegenden Bandes vorbehalten bleiben müssen, welches auch die recht ansehnlich große Literatur über die sogen. elektive Gärung bringen wird. Hier, in diesem Paragraphen, sei aus jenen Feststellungen nur die eine vorweggenommen, derzufolge bei gleichzeitiger Anwesenheit von 25 mehr als einem diffusiblen Kohlenhydrat dasjenige in der Zeiteinheit reichlicher in die Zelle hineindiffundiert, welches den höheren osmotischen Druck ausübt, also z. B. die Glucose mehr als die Fructose. Zufolge E. Prior und H. Schulze (1) ist das Durchlassungsvermögen der Zellmembran bei den einzelnen Hefenarten verschieden groß; vgl. auch die 30 zugehörigen Bemerkungen auf S. 41.

Die **Größe** des **Verbrauches** an **Kohlenhydraten** für den Aufbau der Zellen hängt von der Freudigkeit der Vermehrung und also mittelbar von Art und Größe der diese letztere beherrschenden Einflüsse ab. Pasteur (2) hatte in einer Reihe seiner Zuchten einen für diesen Zweck 35 erfolgten Verbrauch von ungefähr ein Prozent der insgesamt verarbeiteten Saccharose berechnet. Bei der Vermehrung untergäriger Bierhefe in Würze sollen zufolge einer älteren Feststellung durch Balling (1) aus je 100 Teilen des während der Bottichgärung verschwindenden Würzeextraktes (also nicht der Kohlenhydrate allein) 5.323 Teile Hefen- 40 Trockenrückstand entstehen. In einem von Giltay und Aberson (1) angestellten Versuche wurde schon auf 3,8 Teile des insgesamt verarbeiteten Zuckers ein Teil Hefe erhalten.

In einem an assimilierbaren Kohlenhydraten reichen Nährboden lebend, speichern die Hefen beträchtliche Mengen von **Glycogen** in 45 ihrem Zellsafte auf. E. Laurent (2) fand davon in einem Falle 32,6 Proz., auf Trockenrückstand berechnet, vor. Die chemische Kennzeichnung dieses wichtigen Reservestoffes ist schon auf S. 280—282 des I. Bandes, wie auch ausführlicher in einer zusammenfassenden Abhandlung B. Heinze's (1) gegeben worden. Dessen mikrochemische 50 Nachweisung bietet keine Schwierigkeit. R. Braun (1) zufolge verwendet man dazu am zweckmäßigsten die von H. Will angegebene Jodlösung, welche aus 6 g Jodkalium, 2 g Jod und 120 g Wasser zusammengesetzt ist. Durch dieses Reagens wird das Glycogen tief braun

rot gefärbt. Das im Vergleiche zu diesem Farbentone verhältnismäßig sehr blasse Gelb, welches die eiweißartigen Bestandteile der Zelle nach solcher Behandlung aufweisen, wird selbst von dem Anfänger nicht jenem satten Braunrot gleich gehalten werden. Sollte dennoch Zweifel bestehen, so vermag man dadurch Gewißheit sich zu verschaffen, daß 5 man, in Ausnützung einer zuerst durch L. ERRERA (1) gemachten Beobachtung, das mit Jodlösung behandelte Präparat sehr behutsam auf 60—70° C erwärmt: das blasse Gelb der gefärbten Eiweißstoffe bleibt, das Rotbraun des Glycogenes hingegen verschwindet, um dann aber beim Erkalten wieder in seiner früheren Stärke zurückzukehren. Wenn 10 man durch Drücken auf das Deckglas die (zuvor mit Jodlösung behandelten) Zellen zerquetscht, kann man durch flinkes Beobachten unter dem Mikroskope feststellen, daß der gebräunte Inhaltsbestandteil alsbald nach seinem Austreten in die umgebende Flüssigkeit sich in dieser auflöst. Was dann vom Zellinhalt noch übrig ist, zeigt das reine Gelb, 15 wie es alle mit Jod behandelten Eiweißkörper geben. In einigermaßen größerer Menge vorhanden, fällt das Glycogen dem Mikroskopiker schon im ungefärbten Präparate durch sein starkes Lichtbrechungsvermögen auf. Angaben über die örtliche Verteilung des Glycogenes in der Hefenzelle sind schon auf S. 63, 66 und 80 gemacht worden. Auf 20 Veranlassung von L. ERRERA (2) hat E. LAURENT versucht, die Bedingungen zu erforschen, welche einer Anreicherung der Hefenzellen an Glycogen förderlich sind, und hat bemerkt, daß für diesen Zweck das Züchten auf Würzegelatine sehr nützlich ist. Er hat als Glycogenbildner erkannt: Milchsäure, Bernsteinsäure, Aepfelsäure, Asparagin, 25 Glutamin, Eiereiweiß, Pepton, Mannit, Glucose, Lävulose, Saccharose, Maltose. Diesen wurden durch M. CREMER (1) dann noch die d-Galactose und die d-Mannose angereiht. Hingegen befand dieser sowohl die Arabinose, Rhamnose und Sorbose, wie auch die Lactose und das Glycerin als ungeeignet; in betreff letzterer beiden war LAURENT zur gegen- 30 teiligen Behauptung gelangt. E. KAYSER und E. BOULLANGER (1) haben dann den Einfluß einiger äußerer Bedingungen, so z. B. des Luftzutrittes und des Gehaltes der Nährlösung an Weinsäure, Aepfelsäure oder Citronensäure, auf Eintritt und Verlauf der Glycogenaufspeicherung geprüft. Untersuchungen über das Vorkommen von Glycogen bei Brennerei- 35 hefen, Preßhefen und obergärigen Bierhefen unter verschiedenen äußeren Bedingungen hat W. HENNEBERG (1 u. 2) angestellt. Bei *Sacch. apiculatus* konnte es nur selten und kärglich vorgefunden werden. In Zeiten des Nahrungsmangels wird das in der Zelle angesammelte Glycogen wieder abgebaut und umgesetzt. Ueber das in solchem Falle zur Wirk- 40 samkeit gelangende hydrolysierende Enzym der Hefe wird schon im 17. Kapitel eine Bemerkung und im 19. Kapitel dann genauere Angabe gemacht werden, in welch letzterem auch die Rolle des Glycogenes bei der sogen. Selbstgärung der Hefe betrachtet werden soll.

§ 22. Anorganische Stickstoffquellen. 45

Als PASTEUR (1) in seinem Streite mit LIEBIG über die Art der Deutung der Alkoholgärung und über die Natur der Hefe als eines Lebewesens (s. Bd. I, S. 16) im Jahre 1858 die ihn zum Siege führende Beobachtung machte, daß dieser Gärerreger sich in einer Lösung zu betätigen vermöge, welche keinen anderen Stickstoff als ausschließlich 50

solchen in der Bindungsform des weinsauren Ammoniaks zu bieten hatte, war der Begriff „Hefe" selbst noch sehr unbestimmt, lag die Entscheidung darüber, ob die Weinhefe oder die Bierhefe des gemeinen Sprachgebrauches aus mehrerlei Arten von Organismen mit vielleicht recht verschiedenen Nährstoffbedürfnissen zusammengesetzt seien, noch in weiter Ferne und gab es auch noch kein Verfahren, ein solches etwa vermutetes Artengemisch zuverlässig in seine Bestandteile zu zerlegen, um diese dann gesondert einer Prüfung zu unterziehen. So konnte denn auch die Erörterung über jene Beobachtung zunächst keine Klärung bringen und fiel zudem recht dürftig aus. LIEBIG's (1) Bemerkung aus dem Jahre 1869, daß er bei genauester Wiederholung von PASTEUR's Versuch weder Gärung noch auch Vermehrung der Aussaat habe eintreten sehen, glaubte PASTEUR (3) kurzweg durch das Angebot abfertigen zu können, unter der Aufsicht irgend eines Vertrauensmannes seines Gegners auf die in Rede stehende Weise soviel Hefe heranzuzüchten, als dieser „vernünftigerweise verlangen könne". Einen Einwand von seiten MILLON's (1) hatte DUCLAUX (1) im Jahre 1864 widerlegt. Und so wurde denn nach und nach PASTEUR's Behauptung, daß die Hefe ihren Stickstoffbedarf ausschließlich aus anorganischer Quelle, aus Ammoniak, zu decken vermöge, zum unantastbaren Lehrsatz. Gegenteilige Beobachtungen wagten sich nur schüchtern hervor. AD. MAYER (1), der in seinen Untersuchungen aus dem Jahre 1869 über den Stickstoffbedarf der Hefen im wesentlichen ganz auf dem Standpunkte PASTEUR's steht, machte, ebenso wie zuvor schon dieser letztere Forscher selbst und später auch NÄGELI (1), die Bemerkung, daß „die Hefenernährung auf Kosten von Ammoniaksalzen immer etwas schwieriger als auf Kosten des stickstoffhaltigen Hefenextraktes" sei, und fügt hinzu, daß es sich „bei der ersteren um die Zuführung einer größeren Anzahl wohl organisierter Hefen-Elemente handelt, um eine Gärung zu veranlassen." Die Einschränkung, welche in den hier absichtlich gesperrt gedruckten Worten liegt, ist auf ihre Tragweite erst zweiunddreißig Jahre später geprüft worden.

Es war WILDIERS (1), welcher im Jahre 1901 unter Verwendung von Reinzuchten einer obergärigen Bierhefe vom Typus *Saccharomyces cerevisiae I* HANSEN und auch noch anderer Hefenarten gezeigt hat, daß in 125 ccm einer gezuckerten Mineralsalz-Nährlösung, welche den Stickstoff ausschließlich in Gestalt von Salmiak bot, weder Gärungserscheinungen noch auch Hefenvermehrung sich einstellten, wenn er sie nur mit einer sehr geringen Menge von Hefenzellen beimpft hatte, mit ungefähr soviel, als in zwei Tropfen einer in Bierwürze herangewachsenen Zucht oder in 0,25—1,0 ccm einer mit der zehnfachen Wassermenge hergestellten Aufschwemmung von Preßhefe enthalten sind. Gärung und Vermehrung traten jedoch dann ein, wenn nebst jener Beimpfung auch noch ein Zusatz von einigen Kubikzentimetern einer Hefenabkochung zugefügt worden war. Anstatt letzterer kann auch Liebig's Fleischextrakt, Pepton oder Würze verwendet werden. WILDIERS schloß aus diesen Befunden, daß die Hefe mit Stickstoff in anorganischer Bindung allein nicht auszukommen vermöge, daß vielmehr zu deren Wachstum und Gärwirkung eine gewisse Menge einer besonderen, noch unbekannten Substanz unerläßlich sei, welche in den letztgenannten Nährmitteln sich findet, und für die er die vorläufige Bezeichnung **Bios** (griech.: das Leben) vorschlug. Diese Substanz ist in der Asche jener Stoffe nicht vorhanden, wird durch Kochen in 20-proz. Schwefelsäure zerstört (d. h.

unwirksam), ist dialysierbar, in Wasser löslich und durch solches aus den Hefenzellen (insbesondere beim Kochen) ausziehbar. Die Hefe enthalte zwar Bios, sei aber unfähig, solches neu zu bilden. Mit einer kleinen Impfgabe werde davon eine für die weitere Vermehrung nicht ausreichende Menge in die mineralische Nährlösung eingeführt; durch 5 eine reichlich bemessene Beimpfung hingegen gelange davon so viel hinein, daß dadurch auf Kosten absterbender sich neue Zellen zu bilden vermögen.

Diesen Beobachtungen gebührt wegen der ihnen zukommenden großen Bedeutsamkeit für die Lehre von der Ernährung der Hefe eine 10 gründliche experimentelle Prüfung und genauere Verfolgung. Sie begegneten zunächst aber, als gegen das herrschende Dogma verstoßend, bloß bekrittelnden Bemerkungen. Die Abhängigkeit der Art des Ausfalles des Versuches von der Größe der Impfgabe sollte, wie einige meinten, ihren Grund in einem Gehalte der Nährlösungen WILDIERS' an 15 Giften haben, also z. B. an Kupfer, das sich in Spuren im gewöhnlichen destillierten Wasser oder in der Laboratoriumsluft vorfindet, oder an Ultramarin, das in dem damit gebläuten und zum Versuche verwendeten Rohrzucker des Handels enthalten ist, obwohl doch WILDIERS ausdrücklich angibt, daß er auch mit Invertzucker gearbeitet und keinen Unter- 20 schied in den Ergebnissen bemerkt habe. Dem Bios käme dann zunächst die Aufgabe der Unschädlichmachung solchen Giftes zu, durch welches es aber auch seinerseits unwirksam und untauglich für die Hefenernährung würde, so daß also weitere und nur in größeren Impfgaben noch übrig bleibende Mengen davon nötig seien, um für die Zellen verfügbar zu 25 sein. A. AMAND (1) hat diese Meinungen durch eingehende experimentelle Untersuchungen geprüft und hat gezeigt, daß das Bios die Rolle eines Gegengiftes nicht spielt.

Eine der nächsten Aufgaben war die Vertiefung dieses neuen Problemes in quantitativer Hinsicht. WILDIERS hatte den Ausfall seiner 30 Versuche wesentlich nach der Höhe der aus den Zuchten entbundenen Mengen von Kohlensäure beurteilt; über die Anzahl der ausgesäten und der geernteten Zellen hat er keine genaueren Ermittlungen angestellt. Dieses Moment kam, das sei ausdrücklich anerkannt, für die prinzipielle Beantwortung der Frage nicht in Betracht. Die spätere Forschung 35 aber durfte sich nicht der Einsicht verschließen, daß beim Studium der Abhängigkeit der Zellvermehrung man nicht bloß die Größe des Einflusses sondern auch die Größe des Beeinflußten kennen muß. Letzterer Forderung hat zuerst AL. KOSSOWICZ (1) im Jahre 1903 entsprochen. Unter Verwendung von Reinzuchten des *Saccharomyces ellipsoideus I* 40 HANSEN und der Spiritushefe *Rasse II* der Berliner Versuchsstation konnte er z. B. zeigen, daß 200 Zellen von jener ersteren Art, in 100 ccm gezuckerter Mineralsalz-Nährlösung eingesät, sich in 50 Tagen auf 140 Millionen Zellen vermehrten. Er (2) hat später dieses Studium dadurch erweitert, daß er nur je e i n e Zelle aussäte; in 21 von 22 Versuchen 45 blieb in solchem Falle jegliche mikroskopisch feststellbare Entwicklung aus, während der einzige gegenteilige Befund mit übrigens sehr kärglichem Ergebnis vermutlich auf Verschleppung einer mit der eingeimpften Zelle mit übertragenen größeren Menge von Würzegelatine zurückzuführen ist. 50

Den Beobachtungen A. AMAND's (2) zufolge soll in den mit Hefe besäten Nährlösungen der Gehalt an Bios sehr rasch sinken und dann auch in den Zellen nicht mehr nachzuweisen sein, wenigstens nicht auf

dem Wege der Auslaugung. J. Henry (1) glaubt im Gegenteil, dargetan zu haben, daß die Hefe **neues Bios zu bilden** vermöge. Daß diese Fähigkeit aber anderen Pilzen (*Penicillium glaucum* und einer *Mycoderma*-Art) gewiß zukommt, hat zuerst Kossowicz (1) festgestellt. In ge-
5 zuckerten Mineralsalz-Nährlösungen, in denen infolge zu geringer Hefengabe (in Parallelzuchten) die Entwicklung ausblieb, trat aber sowohl solche als auch Gärung in dem Falle ein, wenn jene Eumyceten zusammen mit der Hefe eingeimpft oder zuvor darin gewachsen und durch Erhitzen vor dem Eintragen der Hefe abgetötet worden waren. Diese,
10 durch A. Amand (2) später bestätigte Beobachtung ist nun für die Deutung der Befunde früherer Forscher von Wert. Die Preßhefe des Handels und die Weinhefe (Trub) sind fast immer und die Satzhefen der Brauereien oft mit Mycodermen verunreinigt. Diese aber vermögen, wie durch Winogradsky (1) an einer Art und durch Kossowicz an
15 einer anderen festgestellt worden ist, ihren Stickstoffbedarf selbst bei reichlicher Vermehrung einer ganz geringen Aussaat ausschließlich aus Ammoniumsalzen zu decken. Sie werden also, wenn sie durch eine mit ihnen behaftete Hefenbeimpfung in Mineralsalz-Nährlösung gelangen, sich trotz ihrer zu Anfang verhältnismäßig sehr geringen Anzahl zu-
20 nächst entwickeln und dann im obigen Sinne den Nährboden für die Zwecke der bis dahin zur Ruhe bemüßigten Hefe vorbereiten. Tatsächlich gibt auch Ad. Mayer (1) an, daß in seinen, schon auf S. 98 angeführten Untersuchungen fast immer „*Mycoderma vini*" auftrat: seine Feststellungen gelten also, wie man nun erkennt, gar nicht für die
25 Hefe allein und beweisen in der Frage der Stickstoffernährung der Hefe heute nur noch das Eine, daß nämlich auch hier nur solche Versuche zuverlässige Ergebnisse liefern können und der Mühe der Anstellung wert sind, welche von Anfang bis zu Ende mit Reinzuchten durchgeführt werden. Nur derart gewonnene Befunde können fürderhin
30 Anspruch auf Beachtung erheben.

Das eben dargelegte Problem ist zu neu, als daß sich schon jetzt ein abgeschlossenes Urteil darüber abgeben ließe. Jeder Tag kann eine neue Beobachtung bringen, welche eine ganz unerwartete Perspektive eröffnet. Darum war in vorstehenden Zeilen eine sehr knappe Dar-
35 stellung geboten. Eines aber steht wohl als Tatsache heute schon fest: daß in einer gezuckerten Mineralsalz-Nährlösung, welche den Stickstoff ausschließlich nur in Form von Ammon enthält, Zellvermehrung und Gärwirkung nur dann eintreten, wenn die Anzahl der eingeimpften Zellen nicht unter ein Minimum hinabgeht, welches in seiner absoluten
40 Größe noch nicht genau bestimmt und wahrscheinlich von den übrigen Versuchsbedingungen abhängig ist.

Mit dieser eben umschriebenen Feststellung soll aber nicht auch gesagt sein, daß die Hefen gegen **Ammoniumsalze** sich unbedingt ablehnend verhalten, vorausgesetzt, daß im übrigen die Bedingungen für
45 ihre Entwicklung erfüllt sind. Im Gegenteil, sie zeigen unter dieser letzteren Voraussetzung sogar eine gewisse Vorliebe für Ammoniakstickstoff. Duclaux (2) hatte dies schon im Jahre 1866 bei seinen Untersuchungen über die Gärung des Weinmostes bemerkt. Des letzteren Gehalt an jenem Elemente fiel infolge des Verbrauches durch die darin
50 gezüchteten Hefen von 120 mg auf wenige mg pro Liter. Müntz und Rousseaux, dann Roos und Chabert und schließlich J. Laborde (1) haben sich damit weiter beschäftigt. Dem letzteren zufolge wird bei der Temperatur von 28° C der Ammoniak-Stickstoff stärker in Anspruch

genommen als der organisch gebundene; bei 36° C hingegen sei dies umgekehrt. Der *Saccharomyces Zopfii* soll zufolge Artari (1) sogar mit schwefelsaurem Ammon als alleiniger Stickstoffquelle zufrieden sein. In betreff des Verhaltens der Mycodermen gegen Ammoniumsalze wird das 14. Kapitel des vorliegenden Bandes nähere Angaben bringen.

Die **Nitrate**, welche für die höheren Pflanzen die weitaus beste, ja für die meisten sogar die einzige Stickstoffquelle sind, haben — von wenigen Ausnahmen abgesehen, zu denen der *Sacch. acetaethylicus* Beijerinck's (1) gehört — für die Hefen keinen Wert. Ad. Mayer (1) hat dies zuerst festgestellt. Die durch Dubrunfaut (1) ausgesprochene gegenteilige Behauptung ist durch E. Laurent (1) widerlegt worden. Die schädigende Wirkung, welche die Anwesenheit solcher Salze in einer im übrigen günstigen Nährlösung auf die Hefen ausübt, scheint auf die Reduktionstätigkeit der Zellen zurückzuführen zu sein, durch welche die sehr giftigen Nitrite entstehen. Von den Ursachen, welche so oft Störungen der Vergärung in den Melassenbrennereien herbeiführen, ist eine gewiß in der Anwesenheit von Nitraten zu suchen, welche ja manchmal in sehr beträchtlicher Menge in den Melassen sich vorfinden. Aehnliche Folgen hat L. Briant (1) aber auch in Brauereien, welche nitratreiches Wasser verarbeiten müssen, beobachtet. Er gibt einen Gehalt von 5 g Nitrat pro Gallone (4.5 l) als erträgliche Grenze an. Ueber die Beeinflussung der Höhe des Vergärungsgrades (s. 6. Kap. d. V. Bds.) durch die Nitrate hat Evans (1) einige Versuche angestellt. J. Effront (1) verwendet bei seinem unter Patentschutz gestellten Verfahren zur Heranzüchtung von Hefenrassen, welche kräftig Dextrine zu vergären (s. das 19. Kap. dieses Bandes) vermögen, angeblich einen Nährboden, welcher als Stickstoffquelle nur Nitrate enthält.

§ 23. Organische Stickstoffquellen.

In den Würzen, Maischen und Mosten der Gärungstechnik ist die Hefe nicht auf anorganische Stickstoffquellen angewiesen, sondern hat in der Regel eine reichliche Menge von gut assimilierbaren organischen Stickstoffverbindungen zur Verfügung, aus deren großer Schar einige besonders wichtige Vertreter in dem vorliegenden Paragraphen nun auf ihre Tauglichkeit hin näher betrachtet werden sollen.

Von den Amiden, deren einige als Stickstoffnahrung dienen können, verdient eines, nämlich das saure Amid der Asparaginsäure ($COOH—CH_2—CH \cdot NH_2—COOH$), das ist das **Asparagin** ($COOH—CH_2—CH \cdot NH_2—CO \cdot NH_2$), ganz besondere Beachtung. Denn dieses spielt in den Maischen der Gärungstechnik eine Rolle. Es entsteht regelmäßig bei der Keimung der Samen und findet sich so auch im Malz und noch reichlicher in den sogenannten Malzkeimen. Aber auch die Kartoffeln enthalten davon sehr ansehnliche Mengen. In den Melassen der Rübenzuckerfabriken schließlich ist es, neben anderen Amiden, eine der Hauptformen, unter denen der Stickstoff darin auftritt; Proteine hingegen stehen hier ganz zurück, denn diese sind durch die Art der Saftgewinnung aus den Rübenschnitzeln im Diffuseur und der Saftreinigung im Saturateur nach und nach fast ganz ausgeschaltet oder zerstört worden. M. Hayduck (1) hat nun das Asparagin als eine vortreffliche Stickstoffquelle für die Hefenernährung erkannt. E. Laurent (1), G. Heinzelmann (1), H. P. Wijsmann (1) u. a. haben dies bestätigen können. Die Hefe vollzieht die

Umwandlung des Asparagins in Proteine, was der Tierkörper, soweit bisher bekannt ist, nicht vermag. Es wird sich der Stickstoff des als Tiernahrung fast wertlosen Asparagins der in der Brennerei vermaischten Kartoffeln dann in der Schlempe als Eiweiß wiederfinden und so jener den Charakter eines Kraftfutters für Mastvieh verleihen. In einem durch P. Petit (1) angestellten Versuche wurde in einem sowohl Asparagin als auch Ammoniumphosphat enthaltenden Nährboden von jenem ersteren durch eine Oberhefe mehr als doppelt so viel als durch eine Unterhefe verbraucht. Der Genannte meint diese Beobachtung für den Zweck der Unterscheidung von Oberhefe und Unterhefe verwerten zu können. Zufolge einer durch R. Kusserow (2) ausgeführten Vergleichung des Einflusses von Asparagin als Stickstoffquelle in gezuckerter Mineralsalz-Nährlösung einerseits und von Pepton andrerseits, beschleunigt erstere Substanz die Gärung und bewirkt hohe Triebkraft der Ernte. Die Beobachtung, daß bei Ernährung mit Asparagin die Zellen in der erhaltenen Satzhefe ohne Zusammenhang, bei Ernährung mit Pepton hingegen zu Flocken vereint sind, welche weniger fest als jene sich absetzen, ist auch in einem durch H. Lange (1) angestellten ähnlichen Versuche, jedoch unter Verwendung von Bierwürze, beobachtet und dahin aufgeklärt worden, daß dieser Zusammenhang durch ausgefallenes Pepton bewirkt wird. Sehr wählerisch ist der *Schizosaccharomyces octosporus*, welchem, zufolge Beijerinck (2), nur die in Malz oder in Rosinen vorhandenen natürlichen Stickstoffverbindungen und nicht auch Ammoniumsalze oder Asparagin oder Pepton genehm sind.

Unter den Cerealien ist der Roggen durch einen hohen Gehalt an solchen **Proteinen** ausgezeichnet, welche für den Aufbau von Hefenzellplasma erfahrungsgemäß ganz besonders brauchbar sind. Dies ist einer der Gründe, aus denen der Hefenfabrikant, insbesondere der nach dem alten (Wiener) Verfahren arbeitende, seine Maische unter Mitverwendung (meist zu einem Drittel) dieser Getreideart bereitet. Der Gehalt an Stickstoffsubstanzen darin schwankt aber innerhalb weiter Grenzen. Durchaus noch nicht Ausnahmsfälle sind Zahlen dafür von 7,5 Proz. nach unten und 15,3 Proz. nach oben, wie Delbrück (1) in einer lesenswerten Untersuchung darüber gezeigt hat. Den dadurch verursachten großen Schwankungen in der Ausbeute an Hefe sucht der Fabrikant wohl auf die Weise vorzubeugen, daß er Mischungen von Roggen verschiedener Herkunft verwendet. Noch lieber jedoch würde es ihm gewiß sein, wenn er beim Einkauf das angebotene Rohmaterial auf seinen Gehalt an den für ihn hier in Betracht kommenden Proteinen prüfen lassen und danach bewerten könnte. Dazu fehlen aber derzeit noch die Unterlagen. Aus der Gruppe der Proteine und verwandter Körper ist hier noch die **Diastase** zu nennen, welche nicht nur dann als Stickstoffquelle dienen kann, wenn sie der einzige stickstoffhaltige Bestandteil des Nährbodens ist, sondern auch dann, wenn neben ihr Pepton und Asparagin in je ausreichender Menge zugegen sind, durch die Hefe aufgenommen und verarbeitet wird und also als solche verschwindet. Diese durch Heinzelmann (1) gemachte Beobachtung ist im Hinblick auf die Vergärung der Rohfrucht- (Mais- etc.) Maischen von Interesse, in welchen ja das bis dahin unverzuckert gebliebene Dextrin erst während der langen Gärdauer des Bottichinhaltes durch die Diastase hydrolysiert werden soll. In einem durch Heinzelmann (2) angestellten Versuche verschwanden von den ca. 37 diastatischen Einheiten, welche von 100 anfänglichen Einheiten nach dem Maischen noch vorhanden gewesen

waren, deren 33,4 während der Gärung, so daß die vergorene Maische nur noch 3,6 Einheiten aufwies.

Sobald **Amide neben Proteinen** und deren nächsten Abbauprodukten im Nährboden vorhanden sind, wird sich das Wahlvermögen (vgl. Bd. I, S. 361) der Zellen geltend machen können. Auch darüber liegen 5 schon einige lehrreiche Feststellungen vor. Protein-Abbauprodukte finden sich in den zunächst hier in Betracht kommenden Maischen der Brauerei und Brennerei stets vor, entstanden durch die Tätigkeit des im verwendeten Malze enthaltenen proteolytischen Enzymes. In einem der durch C. J. Lintner (1) angestellten Versuche wurden von 10 dem Gesamtstickstoff des als Nährlösung verwendeten gezuckerten Malzauszuges, welcher 0,092 Proz. betrug und sich mit je 0,062 und 0,030 Proz. auf Amide einerseits und auf Proteine etc. andrerseits aufteilte, durch die Hefe 0,036 Proz. aufgenommen, und zwar 0,030 Proz. Amid-Stickstoff und nur 0,008 Proz. Protein-Stickstoff. In einem durch 15 Wahl und Hantke (1) angestellten Versuche wurde das Verhältnis der Mengen von Stickstoff, welche in Gestalt von Proteinen, von Pepton und von Amiden durch die Hefe aus der Würze herausgeholt wurden, angeblich zu 0,4 : 1,7 : 19,9 mg pro 100 ccm ermittelt, bei einem Anfangsgehalt der Würze von 9,0 : 27,4 : 52,0. Also wurden hier vornehmlich 20 Amide aufgenommen. P. Petit und G. Labourasse (1) glauben zwar, aus ihren Beobachtungen den gegenteiligen Schluß ziehen zu müssen. Doch geht auch aus den Ergebnissen der durch R. Kusserow (3) angestellten Versuche hervor, daß die Eiweiß-Abbauprodukte besser als die unveränderten Proteine nähren. Der günstige Einfluß eines Zu- 25 satzes von Malzkeimen zur Maische, insbesondere in den Fällen von träger Gärung reichhaltiger Maischen, ist wohl zum Teil damit zu erklären. Der Einfluß der Art des Maischens (s. 6. Kap. d. V. Bds.) auf den Gehalt der Bierwürze an Eiweißstoffen und dadurch auf den Verlauf der Entwicklung der darin in Tätigkeit zu setzenden Hefe 30 und somit auch auf den Gang der Gärung und den Charakter des entstehenden Bieres wird hier von einer neuen Seite offenbar, insbesondere in den beiden Gegensätzen von Infusionsverfahren einerseits und bayrischer Dickmaischbrauerei andrerseits. Adalb. Flühler (1) war der erste, welcher darauf aufmerksam gemacht und an V. Griessmayer (1) 35 dann einen Fortsetzer gefunden hat. Des letzteren Feststellungen sind, wie C. Lintner (1) berichtet, durch Ad. Ott bestätigt worden.

Ueber die Beziehungen zwischen der **Größe der Ernte** und der Höhe des **Stickstoffgehaltes des Nährbodens** hat Hayduck (1) die ersten beachtenswerten Versuche unternommen und hat festgestellt, daß in einer 40 gezuckerten Mineralsalz-Nährlösung durch eingesäte Preßhefe das als einzige Stickstoffquelle vorhandene Asparagin, wenn es in nicht größerer Menge denn 0,25 Proz. zugesetzt war, vollständig verbraucht wurde. Bei einem diese Grenze übersteigenden Gehalte wuchs zwar die verarbeitete Menge an Asparagin; es blieb jedoch immer ein Teil unzer- 45 setzt übrig. A. L. Stern (1 u. 2) hingegen fand, daß schon 0,025 Proz. Asparagin die Grenze sei, deren Ueberschreitung nach oben keine wesentliche Steigerung der Vermehrung der Zellen mehr im Gefolge habe. In betreff des Harnstoffes als Stickstoffnahrung ist P. Thomas (1) zu einem ähnlichen Ergebnisse gelangt. Iwanowski (1) zufolge soll in einer ge- 50 zuckerten Mineralsalz-Nährlösung die Alkoholgärung um so schwächer ausfallen, je stärker man die Gabe des als Stickstoffquelle gebotenen Peptones bemißt. In Versuchen mit Weinmost, welchem ein Proz. Pepton

zugefügt worden war, hat J. Behrens (1) hingegen durch diesen Zusatz eine Förderung der (durch Reinhefen bewirkten) Gärung bemerken können.

Die **Größe der Stickstoffentnahme** aus dem Nährboden ist zunächst von der Art der Hefe abhängig, wie M. Delbrück (2), Ces. Forti (1) und E. Boullanger (2) beobachtet haben. Sie ist aber selbst bei ein und demselben Stamme je nach den übrigen Ernährungsbedingungen verschieden und z. B. in gelüfteten und stark bewegten Zuchten größer. Dies ist sowohl durch den letztgenannten Forscher wie auch durch Ch. F. Hyde (1) bemerkt worden. Dieser hat festgestellt, daß aus einer gegebenen Würze durch eine große Hefengabe und Lüftung und Bewegung 23,8 Proz. der anfänglich vorhandenen Stickstoffmenge entfernt wurden, hingegen durch eine mittelgroße Hefengabe und ohne Lüftung nur 17,2 Proz. und durch eine verhältnismäßig kleine Hefengabe und geringe Lüftung sogar nur 15,8 Proz. Den Einfluß der *Art der Stickstoffquelle* veranschaulicht die durch A. L. Stern (3) gemachte Beobachtung, der zufolge in Parallelzuchten mit gleich hohem Anfangsgehalt an Stickstoff, welcher entweder als Asparagin oder als Pepton oder als Hefenauszug vorhanden war, die durch die Hefe entnommenen Mengen an diesem Element im Verhältnisse von 1 : 1,8 : 2,2 befunden wurden. Einfluß auf die Größe der Stickstoffaufnahme hat auch die Menge des im Nährboden vorhandenen *Zuckers* (vgl. Bd. I, S. 405), wie sowohl durch P. Thomas (1) als auch durch Stern (2) gezeigt worden ist. Jener erstere Forscher fand, daß von dem als Stickstoffquelle gebotenen Harnstoff mehr assimiliert wurde, wenn nicht 10 sondern 20 Proz. Dextrose zur Verfügung standen. In Stern's Versuchen wurde aus einer Mineralsalz-Nährlösung, welche 0,3 Proz. Asparagin als Stickstoffquelle führte, von jenem dann am meisten assimiliert, wenn der innerhalb der Grenzen von 0—30 Proz. geprüfte Zusatz von Dextrose 15,0 Proz. betrug; wurden jedoch nur 0,15 Proz. Asparagin geboten, so erwiesen sich schon 12,5 Proz. Dextrose als günstigster Zusatz. Man vergleiche auch die auf S. 92 gemachten Angaben.

In den in der Technik zu vergärenden Würzen, Mosten und Maischen ist, von den noch zu nennenden Ausnahmen abgesehen, **Ueberfluß an Stickstoffnahrung** vorhanden, so zwar, daß diese noch lange nicht aufgezehrt ist, wenn infolge der nach und nach eingetretenen Verschlechterung der übrigen Ernährungsbedingungen, insbesondere durch das Anwachsen des Alkoholgehaltes (vgl. d. 6. Kap.) des Nährbodens, die Zellvermehrung schon so gut wie ganz zum Stillstande kommt. Es wird also in dem vergorenen Produkt noch eine mehr oder minder große Menge von brauchbarer Stickstoffnahrung übrig sein. Wie J. von Liebig (1) mitteilt, haben Graham, A. W. Hofmann und Redwood im Jahre 1853 festgestellt, daß eine englische helle *Würze* mit einem Stickstoffgehalte von 0,217 Proz. ein Bier mit 0,134 Proz. lieferte. Aehnliche Ermittlungen, gleichfalls an Infusions-Würzen einer englischen Brauerei, hat dann H. Grimmer (1) angestellt, mit dem Ergebnis, daß von dem Stickstoffgehalt der Stammwürze (0,132—0,138 Proz.) rund der vierte Teil (24—26 Proz.) durch die Hefe entnommen wurde, und zwar die Hälfte bis zu zwei Dritteln davon schon in den ersten 20—24 Stunden nach dem Anstellen. Ch. F. Hyde (1) hat dies bestätigen können. Im wesentlichen die gleichen Beobachtungen hatte Delbrück (1) schon im Jahre 1879 an Preßhefen gemacht. Die Kurve des Stickstoffverbrauches steigt also sehr steil an. Eine Preßhefe und dreierlei Proben von untergäriger Bierhefe (mit 8,24, bzw. 8,94—9,54 Proz. Stickstoff in dem

Trockenrückstand), welche M. HAYDUCK (2) in Malzextrakt-Auflösung, dessen Anfangsgehalt an Stickstoff 0,0876 Proz. betrug, unter ganz gleichen Bedingungen sich entwickeln ließ, entnahmen von diesem Nährstoffe 43, bzw. 30—39 Proz. für die Zwecke des Zellaufbaues. Daß die im Jungbiere verbleibenden Stickstoffsubstanzen noch brauchbare 5 Nährstoffe für weitere Hefenentwicklung zu bieten vermögen, ist schon wiederholt, so z. B. auch durch F. HYDE (1) wie auch durch HAYDUCK (2) dargetan worden. Es würde jedoch verfehlt sein, wenn man annähme, daß die gesamte Stickstoffsubstanz des Jungbieres dazu tauglich oder, daß eine einzelne daraus einer jeglichen Hefenart zugänglich wäre. 10 Leider liegen über diese wichtige Frage bisher nur wenige Beobachtungen vor, so z. B. die durch DELBRÜCK (2) mitgeteilten. Die Erscheinung der sog. Hefentrübung im Lagerbiere (s. 8. Kap. d. V. Bds.) und im lagernden Weine kann durch weitere Forschungen in dieser Richtung noch eine Aufklärung dahin erfahren, daß Proteinstoffe der Würze oder des Mostes, 15 welche durch die während der Hauptgärung tätige Hefe nicht verarbeitet werden konnten, während der Lagergärung dann Baustoffe für die Entwicklung einer anderen Hefenart abgaben, die auf irgend eine Weise sich inzwischen eingeschlichen hatte. Man vergleiche damit auch die im 5. Kapitel des V. Bandes gemachten Bemerkungen betreffend die 20 Lagergärung in den englischen Brauereien. — Auch die Traubenmoste haben gewöhnlich einen Ueberfluß an Stickstoffnahrung für die Hefen, welcher durch diese nicht ganz aufgebraucht wird. H. MÜLLER-THURGAU (2) hat einen Geisenheimer Riesling-Most des Jahrganges 1888, in welchem er immer wieder die entstandene Hefe (Trub) und den durch 25 sie erzeugten Alkohol entfernte und dann frischen Zucker zugab, nacheinander sechs Gärungen durchmachen lassen können, woraus schließlich ein Wein mit 0,051 g Stickstoff pro 100 ccm gegen 0,100 g im Most hervorging, während in den sechs Trubs 0,049 g festgelegt waren. Entsprechend der allmählichen Verringerung des Gehaltes des lagernden 30 Weines an Stickstoff weisen die Bodensatzhefen (Trubs), welche sich nach und nach absetzen und immer wieder von dem darüber stehenden, reifenden Weine abgetrennt („abgestochen") werden, in der Regel immer kleineren Gehalt an Stickstoff auf. Von solchem fanden sich in einem durch A. CZÉH und H. MÜLLER-THURGAU (1) verfolgten Falle 6,19 Proz. 35 im ersten und nur 4,3 Proz. im vierten Trub. Das Gärbild, welches ein Most bietet, wird so auch durch die Art der Behandlung der Reben beeinflußt. MÜLLER-THURGAU (1) berichtet über die stürmische Gärung eines Mostes, welcher infolge starker Düngung des Weinberges einen Stickstoffgehalt von nicht weniger als 0,12 Proz. aufwies. Der im Jung- 40 weine nach Abtrennung („Abstich") der bis dahin tätig gewesenen Hefe noch vorhandene Gehalt an unverbrauchten stickstoffhaltigen Bestandteilen ermöglicht die Ausführung des sog. Umgärens, worüber im Sechsten Abschnitt des V. Bandes nähere Angaben zu finden sind.

Arm an stickstoffhaltiger Hefennahrung sind oft die Apfelmoste 45 und Birnenmoste und geradezu in der Regel die Beerenmoste, insbesondere die Heidelbeersäfte. Sie vergären aus diesem Grunde sehr träge und unvollständig. Dem läßt sich, wie zuerst NESSLER geraten und H. MÜLLER-THURGAU erprobt hat, dadurch abhelfen, daß man Salmiak in der Menge von 20 g pro hl zusetzt. Wer dafür mehr auf- 50 wenden will, mag, wie R. OTTO (1) getan hat, an Stelle jenes Salzes das kostspieligere weinsaure Ammon oder gar Asparagin wählen.

Unzutreffend würde die Annahme sein, daß die gesamte Menge von

Stickstoffsubstanzen, welche in dem Weine oder Biere usw. vorgefunden wird, schon als solche in dem Moste, in der Würze oder in der Maische vorhanden gewesen ist. Nein, ein je nach den Gärungsbedingungen sehr verschieden großer Teil verdankt dem Stoffwechsel der in Tätigkeit ge-
5 wesenen Hefe seine Entstehung, von welcher er ausgeschieden worden ist, um entweder, wenn er löslich ist, der Flüssigkeit sich beizumischen, oder aber, wenn er in den unlöslichen Zustand übergegangen ist, in der Satzhefe sich vorzufinden. Die Menge der aus der Zelle austretenden löslichen Stoffe steigt unter sonst gleichen Bedingungen mit der Tempe-
10 ratur an. E. Hantke (1) hat darüber Versuche angestellt und hat z. B. zeigen können, daß ein Bier, welches unter Verwendung ein und derselben Hefenart aus einer Würze mit einem Gehalt von 5,59 Proz. an Stickstoffsubstanzen gewonnen wurde, von diesen letzteren 4,42 Proz. enthielt, wenn die Gärung sich im kalten Keller der Brauerei abspielen
15 mußte, und hingegen 5,10 Proz., wenn sie im Laboratorium (bei 15° R) vollzogen wurde. Die bei den Praktikern unter dem Namen warmer Gärgeschmack bekannte üble und nach Möglichkeit verhütete Eigenschaft von Bieren, welche die Gärung bei verhältnismäßig zu hoher Temperatur durchgemacht haben, ist der durch diese letztere gesteigerten
20 Absonderung schmeckender Stoffwechselprodukte zuzuschreiben. Derartige Ausscheidungen werden um so mehr sich bemerkbar machen, je ärmer an anderen (schmeckenden) Extraktbestandteilen das Bier ist. Man wird also auch aus diesem Grunde solche (ganz besonders die sog. Pilsener) Biere während der Gärung kälter führen, als die nach dem bayrischen
25 Typus eingebrauten.

Schließlich sei nun noch daran erinnert, daß durch die also festgestellte Tatsache des Uebertretens von Stickstoffsubstanzen aus der Hefe in den Nährboden auch die Glaubwürdigkeit der Ergebnisse all jener Arbeiten über die Stickstoffbilanz von Hefenzuchten erschüttert
30 wird, bei denen die durch die Hefe verarbeitete Menge von Stickstoffsubstanz aus der Differenz zwischen Stickstoffgehalt des Nährbodens zu Beginn und zu Ende der Hefentätigkeit erschlossen worden ist. Es bedarf also auch diese Frage einer Neubearbeitung unter Verwendung verfeinerter Untersuchungsverfahren.

Literatur

zum Kapitel Organische Nährstoffe.

***Amand,** A., (1) La Cellule, 1902, Bd. 20, S. 225. — (2) Ebenda, 1904, Bd. 21, S. 329. ***Artari,** Al., (1) Abhandl. d. Naturf. Ges. zu Halle, 1897, Bd. 21, S. 113. ***Balling,** C. J. N., (1) Die Gärungschemie, 3. Aufl., Prag 1865, Bd. 2, S. 239. ***Behrens,** J., (1) Weinlaube, 1903, S. 412. ***Beijerinck,** M. W., (1) Centralbl. f. Bakt., 1892, Bd. 11, S. 68. — (2) Ebenda, 1894, Bd. 16, S. 49. ***Boullanger,** E., (1) Ann. Pasteur, 1896, Bd. 10, S. 598. — (2) Ebenda, 1897, Bd. 11, S. 720. ***Braun,** R., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1901, Bd. 24, S. 397. ***Briant,** L., (1) J. federated Inst. Brewing, 1899, Bd. 5, S. 372. ***Cremer,** M., (1) Z. f. Biologie, 1894, Bd. 31, S. 183. — (2) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1899, Bd. 32, S. 2062. ***Cross,** C. F., und **Bevan,** E. J., (1) J. federated Inst. Brewing, 1897, Bd. 3, S. 2. ***Cross,** C. F., **Bevan,** E. J., und **Smith,** Cl., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1895, Bd. 28, S. 2604. ***Czéh,** A., und **Müller-Thurgau,** H., (1) Weinbau u. Weinhandel, 1888, Bd. 6, S. 121. ***Delbrück, M.,** (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1879, Bd. 2, S. 310 u. 351. — (2) W. f. Brauerei, 1893, Bd. 10, S. 810. ***Dubrunfaut,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1871, Bd. 73, S. 263. ***Duclaux,** E., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1864, Bd. 58, S. 1114, Bd. 59, S. 450. — (2) Ann. de l'école norm. sup., 1866, Bd. 2. ***Dumas,** J. B., (1) Traité de chimie appliquée etc., 1828—1845, Bd. 6, S. 316. ***Effront,** J., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1899, Bd. 22, S. 126. ***Errera,** L., (1) L'épiplasma des Ascomycètes etc., Thèse d'agr., Brüssel 1882. — (2) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1887, Bd. 5, S. 500. ***Evans,** (1) J. federated Inst. Brewing,

1896, Bd. 2, S. 195. ***Flühler,** Adalb., (1) D. bayr. Bierbrauer, 1872, Bd. 7, S. 167; 1873, Bd. 8, S. 24. ***Forti,** Ces., (1) Bollet. di Notizie agr., 1896, Bd. 18, S. 363. ***Giltay,** E., und **Aberson,** J. H., (1) Jahrb. wiss. Bot., 1894, Bd. 26, S. 543. ***Grießmayer,** V., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1879, Bd. 2, S. 137. ***Grimmer,** H., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1881, Bd. 4, S. 181. ***Guichard,** P., (1) Bullet. Soc. chimique Paris, 1894, 3. sér., Bd. 11, S. 230. ***Hantke,** E., (1) D. amerik. Bierbrauer, 1896, Bd. 29, S. 213. ***Hayduck,** M., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1881, Bd. 4, S. 173. — (2) W. f. Brauerei, 1884, Bd. 1, S. 345 u. 697. ***Heinze,** B., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 12, S. 43; 1905, Bd. 14, S. 9. ***Heinzelmann,** G., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1897, Bd. 20, S. 296. — (2) Ebenda, 1898, Bd. 21, S. 357. ***Henneberg,** W., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1902, Bd. 25, S. 378. — (2) W. f. Brauerei, 1902, Bd. 19, S. 781. ***Henry,** J., (1) Ann. de brasserie et de distillerie, 1902, S. 129; ref. in W. f. Brauerei, 1902, Bd. 19, S. 325. ***Hessenland,** Fr., (1) Zeitschr. d. Ver. f. d. Rübenzucker-Industrie d. Deutschen Reichs, 1892, Bd. 42, S. 671. ***van Hest,** J. J., (1) W. f. Brauerei, 1904, Bd. 21, S. 1. ***Hyde,** Ch. F., (1) J. federated Inst. Brewing, 1895, Bd. 1, S. 380. ***Iwanowski,** D., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1903, Bd. 10, S. 151. ***Kayser,** Ed., und **Boullanger,** E., (1) Étude s. l. ferments nat. de l'hydromel. Paris 1897; ref. in Kochs Jahresber., 1897, Bd. 8, S. 136. ***Kossowicz,** Alex., (1) Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen Oesterreichs, 1903, Bd. 6, S. 27. — (2) Ebenda, S. 731. ***Kusserow,** R., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1897, Bd. 20, S. 106. — (2) Brennerei-Ztg., 1897, Bd. 14, Nr. 318; ref. in Kochs Jahresb., 1897, Bd. 8, S. 84. — (3) Z. f. Spiritusindustrie, 1897, Bd. 20, S. 97. ***Laborde,** J., (1) Ann. Pasteur, 1898, Bd. 12, S. 517. ***van Laer,** H., (1) J. federated Inst. Brewing, 1898, Bd. 4, S. 2. ***Lange,** H., (1) W. f. Brauerei, 1899, Bd. 16, S. 49. ***Laurent,** E., (1) Ann. Soc. belge de Microscopie, 1890, Bd. 14, S. 29. — (2) Ann. Pasteur, 1888, Bd. 2, S. 113. ***Liebig,** J. **von,** (1) Sitzgsber. d. Bayr. Akad., 1868 u. 1869; Liebigs Ann., 1870, Bd. 153, S. 1 u. 137. ***Lintner,** C., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1880, Bd. 3, S. 2. — (2) Ebenda, 1883, Bd. 6, S. 397. ***Lintner,** C. J., (1) W. f. Brauerei, 1884, Bd. 1, S. 3. ***Mayer,** Ad., (1) Unters. ü. d. alkohol. Gärung, d. Stoffbedarf u. d. Stoffwechsel d. Hefepflanze. Heidelberg 1869; Poggendorffs Ann., 1871, Bd. 142, S. 293. ***Mazé,** P., (1) Ann. Pasteur, 1903, Bd. 17, S. 11. ***Meissner,** Rich., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1900, Bd. 6, S. 517. ***Millon,** E., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1863, Bd. 57, S. 235; 1864, Bd. 59, S. 144. ***Mitscherlich,** E., (1) Monatsberichte d. Kgl. Akad. d. Wiss. zu Berlin, 1845, S. 236. ***Müller-Thurgau,** H., (1) Ber. ü. d. Gen.-Vers. d. D. Weinbau-Vereines, 1884, S. 50. — (2) Ber. ü. d. Verhandl. d. XI. D. Weinbau-Kongresses in Trier, Mainz 1889, S. 80. ***Nägeli,** C. **von,** (1) Sitzgsber. d. Bayr. Akad., mathem.-phys. Kl., 1879, Bd. 9, S. 395. ***Otto,** R., (1) Landw. Jahrbücher, 1898, Bd. 27, S. 261. ***Pasteur,** L., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1858, Bd. 47, S. 1011. — (2) Ann. de chim. et de phys., 1860, 3. sér., Bd. 58, S. 323. — (3) Ebenda, 1872, 4. sér., Bd. 25, S. 145. ***Petit,** P., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1897, Bd. 124, S. 93. ***Petit,** P., und **Labourasse,** G., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1900, Bd. 131, S. 349 u. 394. ***Prior,** E., und **Schulze,** H., (1) Zeitschr. f. angew. Chemie, 1901, S. 208. ***Quevenne,** T. A., (1) Journ. de pharmacie, 1838, Bd. 24, S. 265 u. 329. ***Reichard,** Alb., und **Riehl,** A., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1897, Bd. 20, S. 8. ***Schlossberger,** J. E., (1) Liebigs Ann., 1844, Bd. 51, S. 193. ***Stern,** A. L., (1) Transact. Chem. Society London, 1899, Bd. 75, S. 201. — (2) Ebenda, 1901, Bd. 79, S. 943. — (3) J. federated Inst. Brewing, 1902, Nr. 16, S. 199; cit. n. W. f. Brauerei, 1903, Bd. 20, S. 198. ***Thomas,** P., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1901, Bd. 133, S. 312. ***Tollens,** B., und **Glaubitz,** H., (1) J. f. Landwirtschaft, 1897, Bd. 45, S. 97. ***Wahl,** R., und **Hantke,** E., (1) American Brewer's Review, 1894, Bd. 7, S. 492. ***Wijsmann,** H. P., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1891, Bd. 14, S. 381. ***Wildiers,** E., (1) La Cellule, 1901, Bd. 18, S. 313. ***Winogradsky,** S., (1) Arbeiten d. St. Petersburger naturf. Ges., 1884, Bd. 14, S. 132; ref. in Bot. Centralbl., 1884, Bd. 20, S. 165.

5. Kapitel.

Hefenzüchtung und Hefenvermehrung.

§ 24. Die Einzell-Kultur nach Hansen.

In den Proben von Hefe, wie sie entweder aus der Natur in das Laboratorium gebracht oder von der Praxis eingesandt werden, sind die

Zellen nicht selten in einem Zustand der Schwächung und bedürfen darum einer Auffrischung, bevor sie in die für die Zwecke des Reinzüchtens zu verwendende Nährgelatine eingesät werden. So ist es z. B. in den Brauereien üblich, die Hefenprobe auf die Weise durch die Post an das Reinzucht-Laboratorium zu befördern, daß ein höchstens erbsengroßes Tröpfchen der dickbreiigen Satzhefe auf steriles Filtrierpapier aufgetragen und dadurch so weit entwässert wird, daß es dann, in mehrere Lagen von solchem Papier eingewickelt, in einem Briefumschlag abgesandt werden kann. Im Laboratorium dann wird dieses aufgetrocknete Tröpfchen in Würze eingetragen, in welcher die Zellen wieder zu neuem Leben und voller Kraft gelangen. Aehnlich verhält es sich in eingesandtem Weintrub. Die also erforderlichen Falles aufgefrischte Probe wird nun nach dem jetzt zu besprechenden Verfahren zerlegt, dessen Ziel die Gewinnung von Zuchten ist, welche zuverlässig und gewiß aus je *einer* Zelle heranwachsen. Darum heißt dieses Reinzüchtungsverfahren im besonderen *Einzell-Kultur*.

Die Unsicherheit, welche der sog. Verdünnungsmethode anhaftet, ist schon im 22. Kapitel des I. Bandes angedeutet worden. Sie hatte für den hier in Rede stehenden Zweck der Reinzüchtung von Hefen durch E. Chr. Hansen (1) im Jahre 1879 eine Verbesserung erfahren. Er hatte bemerkt, daß in jenen Fällen, in welchen in ein Zuchtgefäß nicht eine sondern mehrere Zellen geraten waren, diese sich, sofern man gut durchgemischt hatte, getrennt voneinander an verschiedenen Stellen des Bodens des Gefäßes niederließen und dort, weil sie ohne die Fähigkeit der Eigenbewegung sind, zu je einer Kolonie heranwuchsen, welche er als *Hefenfleck* bezeichnete. Nur jene Zuchten, in denen bloß *ein* solcher Fleck sich entwickelt hatte, galten dann für Reinzuchten. Die ersten sechs der durch Hansen in die Literatur eingeführten Arten von Saccharomyceten, nämlich *S. cerevisiae I*, *S. Pastorianus I—III* und *S. ellipsoideus I* und *II*, sind auf diesem Wege zustande gekommen. Später (1883) hat Hansen (2) dann der verflüssigbaren festen Nährböden (10-proz. Würze-Gelatine) sich bedient. Dies geschah selbständig und insbesondere auch unabhängig von R. Koch's Verfahren, wie J. Chr. Holm (1) in einer kritischen Studie über die darüber entstandene Frage der Priorität dargelegt hat.

Das Plattenverfahren, wie es in der Bakteriologie in Anwendung steht, liefert, wie schon im 22. Kapitel des I. Bandes bemerkt worden ist, nur in jenem günstigen Falle wahre Reinzuchten, in welchem es durch Schütteln gelungen ist, die in die Nährgelatine eingeimpfte Probe so gut zu zerteilen, daß dann in der gegossenen und erstarrten Gelatine-Schichte die Zellen einzeln festgelegt sind. Diese Voraussetzung ist aber, entgegen der Meinung von G. Topf (1), nicht immer zu erreichen. Hansen (2) hat unter Verwendung eines künstlich hergestellten Gemisches einer Bierhefe mit dem schon auf Grund seiner Zellgestalt allein erkennbaren *Sacch. apiculatus* festgestellt, daß auf den damit angefertigten Platten ungefähr 2 Proz. der herangewachsenen Kolonien unrein, d. h. aus Zellen beider Arten aufgebaut waren. J. Chr. Holm (1) hat in besonderer Versuchsanstellung mit einer Reihe von Reinhefen teils allein, teils in künstlich hergestellten Gemischen gezeigt, daß 100 Kolonien auf Platten von Nährgelatine nach Koch's Verfahren im schlimmsten Falle aus 135 Zellen und im Mittel aller Beobachtungen aus 108 Zellen herangewachsen waren. Noch ungünstiger liegen die Verhältnisse in jenen Fällen praktischer Laboratoriumsaufgabe, in welchen natürliche Gemische

zu zerlegen sind, in denen der Zusammenhang verschiedenartiger Individuen aus mehreren Gründen ein viel häufigerer und innigerer ist. So hat P. MIQUEL (1) gelegentlich einer Luftanalyse festgestellt, daß von 442 Kolonien, von denen 385 aus Bakterien zusammengesetzt waren, nur 136 einer einzigen Art zugehörten, hingegen 87 aus zwei, 75 aus drei und 87 aus vier und mehr Arten aufgebaut waren. Ja es kommen sogar solche gemischte Kolonien vor, welche aus Hefen und Bakterien gemeinsam aufgebaut sind, wie LAFAR (1) gezeigt hat. Die Unsicherheit, welche also dem Plattenverfahren anhaftet, läßt sich auf dem Gebiete der Bakterienforschung wegen der Kleinheit der Zellen nur auf dem Umwege wiederholter Anlegung von Plattenzuchten beheben, wie dies ja auch im 22. Kapitel des I. Bandes anempfohlen worden ist. Auf dem Gebiete der Hefenforschung hingegen vermag man diese Unsicherheit auszuschließen und mit vollständiger Gewißheit Kolonien zu gewinnen, welche nur aus je *einer* Zelle heranwachsen. Denn die Hefen haben verhältnismäßig größere Abmessungen (meist 5—10 μ), sind darum schon mit Mikroskop-Objektiven von viel geringerer Vergrößerung und somit viel weiterem Objekt-Abstand deutlich zu sehen, also ohne befürchten zu müssen, daß das Objektiv in die zu durchsuchende Gelatineschicht eintauche. Man kann demnach die mit der zu zerlegenden Probe beimpfte, frisch gegossene Platte unter dem Mikroskop mit schwacher (40—60-facher) Vergrößerung nach solchen Zellen absuchen, welche nicht nur als einzeln, das heißt ohne einen Genossen, sich erweisen, sondern auch von den nächsten Nachbarn so weit entfernt liegen, daß voraussichtlich auch die daraus entstehenden Kolonien noch von einander getrennt sein und so weit voneinander abstehen werden, daß man von der gewünschten Kolonie zwecks Weiterzüchtung werde abimpfen können, ohne dabei Gefahr zu laufen, eine andere Kolonie zu berühren und von dieser etwas mitzuschleppen. Die Lage derartiger brauchbarer Zellen in der Gelatine-Schichte wird sofort angemerkt, so daß die daraus heranwachsenden Kolonien späterhin leicht und sicher wieder aufzufinden sind und nun Zuchten darstellen, welche zuverlässig von je einer einzigen Zelle abstammen und also Reinzuchten im strengsten Sinne des Wortes sind.

Die Technik der **Herstellung einer Einzell-Kultur** kann hier nur in ihren Hauptzügen kurz dargelegt werden. Ueber die Einzelnheiten und Abarten des Verfahrens muß der Leser auf die dafür in Betracht kommenden Hilfsbücher verwiesen werden, so vor allen auf die von E. CHR. HANSEN (3 u. 7) selbst gegebenen Anweisungen und auf das von ALB. KLÖCKER (1) verfaßte Buch, in welchem die vielen Erfahrungen des Carlsberg-Laboratoriums auf diesem Gebiete niedergelegt sind. Es sei also nur mit wenigen Worten angedeutet, daß man von der (wenn nötig, zuvor aufgefrischten) Probe etwas in sterilisiertes Wasser (oder wohl noch besser in 0,5-proz. Kochsalzlösung) bringt und durch Schütteln oder Schwenken darin so gut als möglich zerteilt und die Zellhaufen und Zellverbände auseinanderreißt. Man prüft ein Tröpfchen dieser Verdünnung unter dem Mikroskop auf die Größe seines Zellgehaltes. Entsprechend diesem Befunde impft man von jener dann soviel in ein bereitgehaltenes Kölbchen mit (20—100 ccm) verflüssigter Würzegelatine (bzw. Mostgelatine) über, daß ein ganz kleines Tröpfen von dieser letzteren dann nur eine geringe Anzahl von Zellen aufweisen wird. Mit einem solchen Tröpfchen wird nun eine Miniatur-Plattenkultur angelegt. Man zieht ein größeres Deckglas, um es zu sterilisieren, leicht durch die

Flamme und trägt, unter Verwendung einer engen Platinöse, auf dessen eine Seite recht gleichmäßig eine ca. 0,2 mm dicke Schichte der beimpften Gelatine derart auf, daß ringsum ein mehrere Millimeter breiter Rand frei bleibt. Das Deckglas wird dann auf den mit Vaseline bestrichenen Ring (*c*) einer vorbereiteten, sterilisierten BÖTTCHER'schen Kammer (*Fig.* 52) aufgedrückt, auf deren Boden man zuvor ein winziges Tröpfchen sterilen Wassers (*d*) ausgebreitet hatte. Horizontale Lage der feuchten Kammer auf einer geeigneten Unterlage und mittlere Zimmertemperatur (15°) vorausgesetzt, wird die (nach innen gekehrte) Gelatine-Schichte (*b*) bald gleichmäßig erstarren. Anstatt solcher Kammer kann man sich auch eines hohl geschliffenen Objektträgers bedienen. Es empfiehlt sich, nicht bloß eine sondern mehrere derartige Plattenzuchten anzulegen. Sobald die Schichte fest geworden ist, bringt man die Kammer unter das Mikroskop. Sehr bequem ist dazu ein solches, welches durch einen angebrachten Revolver eine rasche Umwechslung der zwei hierfür erforderlichen Objektive von verschieden starker Vergrößerung (z. B. von ZEISS die Nummern A und D) erlaubt. Mit der schwächeren (ca. 40 bis 60-fach) durchsucht man nun systematisch die Gelatine-Schichte Stelle für Stelle nach geeigneten Zellen, welche einzeln sind und von allen Nachbarn ferne genug liegen. Man vergewissert sich dessen unter vorübergehender Anwendung der stärkeren (ca. 250—400-fachen) Vergrößerung und stellt die Lage einer solchen ausgewählten Zelle dann fest. Die verschiedenen Kunstgriffe und Hilfsmittel, welche dazu, also zur Feststellung der Lage der Zellen bei der Einzellkultur, in Anwendung kommen, hat H. WILL (1) auf Grund seiner reichen Erfahrung einer kritischen Besprechung unterzogen. Als einfachste und bequemste Art und insbesondere für Anfänger lange nicht so heikel wie die Anwendung des sog. Objektmarkierers hat sich mir die direkte Bezeichnung bewährt, so ausgeführt, daß man die Zelle unter Anwendung der schwachen Vergrößerung (mit ca. 1 cm Objektabstand) zwischen zwei feine Tintenpunkte oder besser noch Schwarzlack-Punkte einschließt, welche man mit Hilfe einer feinen, dünnen Zeichenfeder oder eines zugespitzten Impfhäkchens auf die Oberseite des Deckgläschens aufsetzt. Man versucht, auf diese Weise ungefähr ein halbes Dutzend oder noch mehr Zellen zu „markieren". Dies ist nötig, denn nicht selten bleibt bei der einen oder der anderen Zelle die Vermehrung aus, sei es, weil sie zu Versuchsbeginn schon tot war, oder weil sie nicht kräftig genug war, um sich in dem gelatinereichen (10-proz.) Nährboden entwickeln zu können. Das Absuchen ist selbst für den Geübten ein recht ermüdendes Geschäft. Es wird wesentlich erleichtert, wenn man nicht gewöhnliche sondern solche Deckgläser verwendet hat, welche nach WILL's Vorschlag eine eingeätzte Teilung in Quadrate (von ca. 2 mm Seitenlänge) tragen, die allenfalls auch, wie ALFRED JÖRGENSEN empfohlen hat, noch durch eingeätzte Ziffern numerirt sind. Dies ist auch aus dem Grunde sehr zu empfehlen, weil dadurch das Notieren der über die Zellen gemachten Beobachtungen im Tagebuche wesentlich vereinfacht wird. Sobald man die Markierung abgeschlossen hat, legt man die BÖTTCHER'schen Kammern in eine größere Doppelschale und beläßt sie durch ca. 20 Stunden im

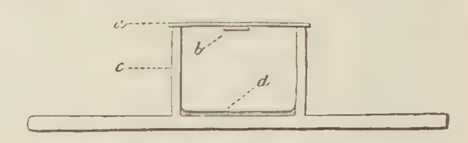


Fig. 52. Böttcher'sche Kammer im senkrechten Schnitt. Etwas verkleinert. Nach HANSEN.

Thermostaten (bei ca. 20° C). Nach Ablauf dieser Zeit wird man die entwicklungsfähigen Zellen in schöner Kolonienbildung begriffen finden. Nach weiteren 24 Stunden wieder betrachtet, sind die herangewachsenen Kolonien schon mit freiem Auge als kleine, weiße Punkte sichtbar; über deren Aussehen und Art des Aufbaues war schon auf 5 S. 22—23 die Rede. Man prüft die ausgewählten unter ihnen auf gefährliche Nachbarn nochmals bei schwacher Vergrößerung durch, impft hierauf von je einer Kolonie in je eines der bereit gehaltenen Kölbchen mit sterilisierter Nährlösung (Würze, Weinmost etc.) und vergewissert sich schließlich durch eine abermalige Prüfung unter dem Mikroskop, 10 daß man nur von den ausgewählten Kolonien entnommen hat und daß also die Nachbarkolonien unverletzt sind. Wer mit einem Häkchen abgeimpft hat, wird es wohl bequemer finden, die Zellen in ein Kölbchen nach FREU- 15 DENREICH oder nach CHAMBERLAND (*Fig. 53*) einzutragen und erst von da, nach erfolgter Vermehrung, eine Oese voll in ein Pasteur- 20 kölbchen (*Fig. 54*) von ca. 250 ccm Fassungsraum und ca. 100 ccm Würze-Beschickung überzuführen. Hingegen vermag man ganz 25 bequem sofort in letzteres Zuchtgefäß dann einzuimpfen, wenn man das Impfen von der Kolonie mit Hilfe eines ungefähr ein 30 Centimeter langen und ein halbes Millimeter dicken Stückes von Platindraht bewerkstelligt hat, welches zu dem Zwecke mit einer Pincette angefaßt und unmittelbar vor Gebrauch in der Flamme sterilisiert wird. 35



Fig. 53. Kölbchen nach Chamberland. Ungefähr ein Fünftel der natürl. Größe. Nach HANSEN.

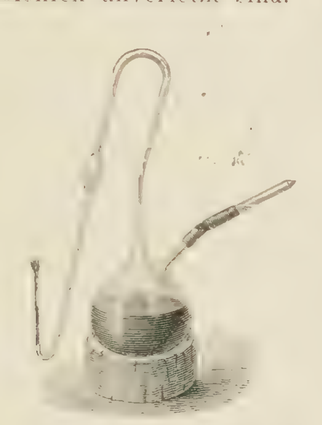


Fig. 54. Pasteur-Kolben mit Hansen's verbessernder Abänderung durch Ausweitung des Schwanenhals-Rohres. Ungefähr ein Fünftel der nat. Größe. — Nach HANSEN.

Das oben empfohlene Auffrischen kann auch noch die Nebenwirkung oder sogar das angestrebte Ziel einer Vorreinigung der Probe haben. So z. B. läßt H. MÜLLER-THURGAU (1) bei der Reinzüchtung von Hefen, welche für die Vergärung der an Gerbstoff sehr reichen Rotwein- oder Birnwein-Maischen in Dienst gestellt werden sollen und also 40 gegen größere Mengen dieser Substanz unempfindlich sein müssen, den als Ausgangsmaterial zu verwendenden Trub mehrere Male in Rotmost oder in herbem Birnenmost sich vermehren und erreicht dadurch schon eine Auslese, welche viel eher hoffen läßt, daß die auf dem Wege der damit vorzunehmenden Einzell-Kultur zu gewinnenden Zuchten die in sie ge- 45 setzten Erwartungen erfüllen werden.

Als **Tröpfchenkultur** hat P. LINDNER (1 u. 2) eine von ihm angegebene Abänderung von HANSEN's Einzell-Kultur bezeichnet. Er stellt von der zu zerlegenden Probe eine so starke Verdünnung in Würze her, daß ein kleines Tröpfchen davon bloß eine einzige Zelle enthält, 50 und setzt, unter Verwendung einer sehr feinen und zuvor sterilisierten Zeichenfeder, eine Anzahl solcher Tröpfchen oder feiner Striche auf ein zuvor flambiertes Deckglas auf, welches er dann auf dem Ring der

Böttcher'schen Kammer oder auf einem hohl geschliffenen Objektträger vermittelst Vaseline oder dgl. festkittet und hierauf unter dem Mikroskope untersucht. Markiert werden jene Tröpfchen, welche nur eine einzige Zelle enthalten. Die daraus heranwachsende Nachkommenschaft wird schließlich auf einen anderen Nährboden (Würzegelatine, Würze) übertragen. Das Schrumpfen der Zellen, wie es in der stark plasmolysierenden Nährgelatine eintritt, bleibt hier aus, und infolge dessen ist der Prozentsatz an Zellen, welche sich nicht entwickeln, kleiner. Es ist auch der den Grad der Deutlichkeit des Erkennens bestimmende Unterschied des Lichtbrechungsvermögens der Zelle einerseits und des umgebenden Mittels andrerseits größer und damit auch das Auffinden der Zellen leichter als bei Verwendung des festen Nährbodens. Eine Vereinigung des Aeußerlichen dieses Verfahrens mit dem Wesen von Hansen's Einzell-Kultur hat F. Schönfeld (1) für nützlich befunden. Er versetzt ein wenig der Probe (Geläger, Satzhefe) mit Würzegelatine und trägt von diesem Gemische feine Tröpfchen und Striche auf ein Deckglas auf, welches dann auf dem hohl geschliffenen Objektträger befestigt wird.

Mit geschehener Ueberimpfung von einer Einzell-Kultur in einen frischen Nährboden ist eine absolute Reinzucht gewonnen. Die mit dieser vorzunehmenden Arbeiten haben dann andere Ziele, so insbesondere die Prüfung daraufhin, ob sie der an sie zu stellenden Aufgabe gewachsen ist, weiters die Auswahl der tauglichsten aus einer Reihe von Reinzuchten gleicher Herkunft und schließlich die Vermehrung zu solcher Menge, wie sie für die Anwendung im Betriebe erforderlich ist. Nähere Angaben darüber sind insbesondere im 5., 7., 10., 11. und 17. Kapitel des V. Bandes zu finden.

Ueber die beste Art der **Aufbewahrung der Reinzuchten** im Laboratorium sollen noch einige Bemerkungen für den Anfänger angefügt werden. Am bequemsten ist es wohl, wenn man die Hefe ruhig unter jener Flüssigkeit liegen lassen kann, in welcher sie herangewachsen ist. Derart darf man jedoch nur dann verfahren, wenn man Muße genug oder durch Erledigung von Hefenbestellungen für die Praxis genügend oft äußere Veranlassung hat, die Zuchten in kurzen Zwischenzeiten immer wieder in frische Nährlösung zu übertragen. Unterläßt man dies und beläßt man also die Zellen längere Zeit in der durch sie verarbeiteten Flüssigkeit, so werden sie durch die Produkte des Stoffwechsels und der Gärung geschädigt werden. Die Größe der Frist, binnen welcher, um diese Gefahr zu verhüten, die Ueberimpfung vorgenommen werden muß, hängt nicht bloß von der Beschaffenheit des Nährbodens sondern auch von der Art der Hefe ab. So hat H. Müller-Thurgau (3) mitgeteilt, daß er die von ihm daraufhin geprüften Arten von Weinhefe ungefähr 10 Monate unter dem von ihnen erzeugten Weine belassen durfte, ohne daß sie dabei eine merkliche Schädigung erfuhren. Ein Gegenstück dazu ist nach meinen Erfahrungen die Spiritushefe *Rasse II*, bei der schon ein dreimonatliches Verweilen unter der vergorenen Würze eine wenngleich wieder vorübergehende so doch ganz deutliche Schwächung (insbesondere der Vermehrungskraft) im Gefolge hat. Das lebende Herbarium eines gärungsphysiologischen Laboratoriums, also dessen Sammlung von Zuchten von Kleinlebewesen, weist gewöhnlich eine recht große Anzahl von Hefen auf. Darunter finden sich auch solche — so insbesondere die Hefen für die Weinbereitung und die Beerenweinerzeugung, dann die sog. wilden Hefen

u. dgl. m. — zu deren Ueberimpfung weniger oft oder sogar nur in Ausnahmsfällen ein äußerer Anlaß gegeben ist. Die Ueberimpfungen erfordern immerhin einen beträchtlichen Aufwand an Zeit und Mühe, soferne, wie dies ja an und für sich erwünscht ist, die Sammlung eine größere Anzahl von Nummern umfaßt. Um diese Arbeit so selten vor- 5 nehmen zu müssen, als dies zulässig ist, wird man die Hefen in jenes Mittel übertragen, in welchem sie erfahrungsgemäß am längsten verbleiben können, ohne dadurch eine Veränderung ihres Charakters zu erleiden. Bierwürze, als der für Brauereihefen gewöhnlich gebrauchte Nährboden, ist für lange währende Aufbewahrung nicht tauglich. Hin- 10 gegen hat dafür eine wässerige 10-proz. Saccharose-Lösung, wie sie durch E. Chr. Hansen (7) erprobt und empfohlen worden ist, sich meist gut bewährt. Zu deren Aufnahme wählt man gewöhnlich Kölbchen nach Freudenreich oder solche mit der durch Hansen angebrachten Abänderung (s. *Fig. 55* auf S. 114). Man beschickt sie etwas über 15 halbvoll. Um die unvermeidliche Eindunstung auf ein Geringstmaß zu beschränken, hat J. Chr. Holm (2) dem Käppchen (Haube) des Kölbchens einen besonderen Bau gegeben. Die Flüssigkeit darf nur mit einer so geringen Menge von Dépôt der zu konservierenden Zucht beschickt werden, daß sie dadurch leichte Trübung annimmt. In diesem Falle tritt, 20 wie gewünscht, nur eine unbedeutende Vermehrung der Aussaat und geringe chemische Veränderung der Flüssigkeit ein. Denn es ist nicht Zellvermehrung sondern Zellkonservierung das Ziel, und es ist darum die Aufteilung des stickstoffhaltigen Nahrungsvorrates, welchen die Zelle mitbringt und von dem sie ja während der Zeit ihres Verbleibens in 25 der Zuckerlösung zehren und sich erhalten muß, auf eine gewiß schwächlichere Nachkommenschaft nach Möglichkeit zu verhüten. Diese Ueberimpfungen nun sind dann fernerhin im Dunkeln und bei einer Temperatur zu halten, welche 15° C nicht weit überschreite. Unter solchen Bedingungen haben von den durch Hansen (5) daraufhin der Beobachtung 30 unterzogenen Arten (ungefähr 50 an der Zahl) fast alle sich durch viele (bis 17) Jahre lebendig erhalten. Als empfindlicher erwiesen sich der *Sacch. Ludwigii*, welcher in manchen Fläschchen schon nach 1—2 Jahren, in anderen allerdings erst nach 6 Jahren, abgestorben war, und die ähnlich sich verhaltende *Carlsberg Unterhefe Nr. 2*. Diesen Ausnahmen 35 sind der aus rottendem Kakao durch A. Preyer (1) reingezüchtete *Sacch. theobromae* und zufolge J. Chr. Holm (2) noch einige Arten der Gattung *Schizosaccharomyces* zuzuzählen, deren eine in Saccharose-Lösung schon nach einem Jahre abgestorben war, in Würze aber noch nach $2\frac{1}{2}$ Jahren lebendig befunden wurde. Für alle übrigen (daraufhin geprüften) er- 40 wies sich die Bierwürze hingegen als unverläßlich. In nicht wenigen Fällen freilich wurden darin lebende Zellen noch nach 10 Jahren, ja sogar nach 11 Jahren, vorgefunden. Aber nicht weniger oft suchte man nach solchen schon nach einem Jahre vergebens. Die Beschaffenheit dieser Flüssigkeit ist eben großen Schwankungen unterworfen, welche 45 sich unserer Beeinflussung und Beurteilung entziehen. In Ländern mit heißem Sommer wird man während dieser Jahreszeit für künstliche Kühlhaltung der Zuchten zu sorgen haben, widrigenfalls auch in Saccharose-Lösung sich Entartung und Absterben einstellen, wie H. Will (4) in München und auch A. Kukla (1) in Prag bemerkt haben. Man be- 50 nötigt dazu eigens gebaute Eisschränke. Von der Anlegung von Strichzuchten auf Würzegelatine für den in Rede stehenden Zweck hat Alfr. Jörgensen (1) auf Grund übler Erfahrungen abgeraten. In betreff

der auf alternden Zuchten in Nährlösungen eintretenden Hautbildung und ihrer Folgen sei auf S. 18—19 rückverwiesen.

Der Farbenton der Bierwürze erfährt durch die darin tätige Hefe eine Milderung und zwar nicht bloß während der Hauptgärung, wie jedem Brauer bekannt ist, sondern in noch viel stärkerem Maße dann, wenn das ausgegorene Bier längere Zeit über dem Hefenabsatz steht, wie dies also bei der Aufbewahrung von Hefenzuchten in Würze der Fall ist. Es tritt da nach und nach ein sehr weitgehendes Verblassen des Nährbodens (s. S. 18) ein, so zwar, daß die Farbe vom anfänglichen Braun in ein helles Strohgelb sich umwandeln kann. Die durch H. Will (2 u. 3) über diese Entfärbung der Würze angestellten Untersuchungen haben erkennen lassen, daß im allgemeinen die wilden Hefen stärker entfärbend wirken als die Kulturhefen.

Handelt es sich darum, eine Reinzucht aus einem Laboratorium an ein zweites zu übermitteln, welches zu deren Weitervermehrung über die dafür erforderliche Einrichtung verfügt, dann verfährt man auf die Weise, daß man von der Zucht eine geringe Menge — denn es genügen ja zu dem Zwecke schon ein paar lebenskräftige Zellen — auf ein wenig nicht entfettete (und darum etwas hygroskopische und also den Zellen das erforderliche Geringstmaß von Feuchtigkeit und damit höhere Lebensdauer sichernde) Baumwolle aufträgt, welche am Grunde eines Kölbchens nach Freudenreich oder nach Freudenreich-Hansen liegt und in diesem zuvor durch trockene Hitze sterilisiert worden ist. Das zweitgenannte Gefäß, welches in *Fig. 55* abgebildet ist, unterscheidet sich von dem anderen durch den Besitz des schiefen Seitenrohres. Dieses gestattet die Herstellung der Verbindung mit einem Pasteurkolben ebensowohl bei der Einführung eines Tröpfchens der aufzubewahrenden Zucht auf die Baumwollschicht (*e*) wie auch dann, wenn jene in frischer Nährlösung zu neuer Tätigkeit gebracht werden soll. Die Dichtigkeit des durch einen Stöpsel aus gerolltem Asbestpapier (*d*) angestrebten Verschlusses wird durch einen dünnen Ueberzug von Siegellack (*c*) gesichert. Der Wattepfropfen (*b*) im Halse des Fläschchens verhütet ein zu rasches und zu starkes Austrocknen der eingeführten Zellen und versperrt zudem auch noch Fremdkeimen, welche durch das Wattefilter (*a*) des Käppchenrohres etwa sich durchzuschleichen vermocht haben, den Weg nach dem Innern. Diese Art der Haltbarmachung auf Baumwolle ist insbesondere dann von Wert, ja geradezu unersetzlich, wenn absolute Reinzuchten nach tropischen Gegenden versandt werden sollen und auf dem Wege dahin lange Zeit hoher Lufttemperatur ausgesetzt sind. Strichzuchten auf Gelatine und auch auf Agar, welche bei geringeren Entfernungen innerhalb der gemäßigten Zone ab und zu auch in Anwendung kommen können, sind ja für jenen Fall ausgeschlossen. Ausführliche Angaben über die Haltbarmachung größerer, für die unmittelbare Verwendung im Betriebe ausreichender Mengen von Hefe zwecks Versendung nach einem weit entfernten Bestimmungsorte wird das 5. Kapitel des V. Bandes bringen.

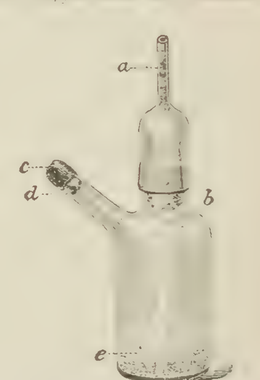


Fig. 55. Kölbchen nach Freudenreich-Hansen, zum Hefenversand hergerichtet. Erklärung im Text. — Auf ungefähr die Hälfte verkleinert. Nach Hansen.

§ 25. Bedingungen der Zellvermehrung.

Von den beiden Möglichkeiten der Zellvermehrung der Hefen, nämlich dem als Sprossung bezeichneten vegetativen Vorgang einerseits und dem der Ascosporenbildung andrerseits, kommt der zweite, also die Sporulation, für die Praxis der Hefenzüchtung als solcher nicht weiter 5 in Betracht. Denn er würde ja nur zu einer beschränkten und verhältnismäßig geringen Vermehrung der Zellen führen. Die Sprossung nun, mit welcher wir uns nachstehend also allein befassen werden, hat zwar schon in den §§ 2 und 3 ihre Betrachtung gefunden; jedoch mußte dort der Standpunkt des Morphologen eingehalten werden, und das 10 Hauptaugenmerk ist auf die Verschiedenartigkeit der Zellgestalten und Zellverbände gerichtet gewesen, welche auf dem Wege der vegetativen Vermehrung zustande kommen können. Diese Darlegungen erhalten nun in dem vorliegenden Paragraphen eine Ergänzung in der Betrachtung der äußeren Bedingungen der Zellvermehrung. Von der für diese er- 15 forderlichen Beschaffenheit des Nährbodens haben schon die vorhergehenden zwei Kapitel gehandelt. Bevor wir in die Erörterung dieser Frage eintreten, müssen wir noch die Umgrenzung dreier Begriffe vornehmen, welche hierbei in Anwendung kommen sollen.

Als Vermehrungsvermögen, ab und zu auch Vermehrungs- 20 koeffizient, bezeichnet man die auf die Einheit der Aussaat bezogene Menge der unter bestimmten Bedingungen überhaupt (und also ohne Rücksicht auf die dafür erforderliche Zeit) erreichbaren Hefenernte. Die Einheit kann entweder eine solche nach dem Gewichte sein. In diesem Falle wird z. B. ein Vermehrungsvermögen von 20 besagen, 25 daß aus 1 g ausgesäter Hefe 20 g Hefenernte entstanden sind. Diese letztere wird gewöhnlich in Gestalt eines Dépôts (s. S. 5) gewonnen und entweder in gepreßtem Zustande mit einem je nach der Stärke der Pressung wechselnden Wassergehalt oder in getrocknetem Zustande auf die Wage gebracht. Das letztere würde, insbesondere bei Versuchen 30 über den Nährstoffverbrauch, das Zuverlässigste sein, wenn das Dépôt nur aus Hefenzellen allein bestünde, was aber, wie wir wissen (s. S. 46 und 83), gewöhnlich nicht der Fall ist. Aus diesem Grunde kommt den auf die Gewichtseinheit bezogenen Angaben über die Vermehrungsgröße nur ein geringer und bedingter Wert zu. Von verhältnismäßig viel 35 größerer Zuverlässigkeit sind die auf die Zelleinheit der Aussaat bezogenen Ermittlungen, welche mit Hilfe der Zählkammer (s. 7. Kap. des V. Bds.) vorgenommen werden.

Unter Vermehrungskraft, auch Vermehrungsgeschwindigkeit oder Vermehrungsenergie, versteht man den Zahlen- 40 ausdruck für die Menge an Hefenernte, welche in der Zeiteinheit aus der Einheit der Hefenaussaat heranwächst. In betreff der Bestimmung dieser Menge gelten die eben zuvor gemachten Bemerkungen.

Unter Generationsdauer hingegen versteht man meist jene Zeitspanne, welche erforderlich ist, damit aus einer Mutterzelle eine 45 vollerwachsene Tochterzelle auf dem Wege der Sprossung entstehe. Wenn man die Bestimmung dieser Größe (x) nicht durch unmittelbare Beobachtung an der einzelnen Zelle vornehmen, sondern aus der Anzahl der Zellen der Aussaat (a) und der Ernte (b) einer angelegten Zucht rechnerisch mit Hilfe der von Fr. Basenau (1) gegebenen Formel 50 $x = \frac{t \cdot log\, 2}{log\, b - log\, a}$ ableiten will, muß man sich daran erinnern, daß diese

letztere nur unter der Voraussetzung streng gültig ist, daß die Generationsdauer für alle Zellen der Zucht während der ganzen Dauer (*t*) des Versuches die gleiche gewesen ist und daß jede neu entstandene Tochterzelle sofort wieder als Mutterzelle gewirkt hat. Insbesondere 5 diese zweite Bedingung wird meist nicht ganz erfüllt sein, so daß die Rechnung dann einen zu großen Wert für die Generationsdauer finden läßt.

Der **Einfluß** der **Temperatur** auf die Zellvermehrung durch Sprossung bedarf vor allem und um so mehr einer genaueren Betrachtung, als ja unter den Verhältnissen der Praxis, welche meist einen Nährboden von 10 ziemlich gleicher und wenig veränderbarer Beschaffenheit zu verarbeiten hat, gerade jener Einfluß in seiner zweckmäßigen Abtonung es möglich macht, das Vorschreiten der Vermehrung in den gewünschten Bahnen zu führen. Die Temperaturgrenzen, innerhalb derer überhaupt Sprossung der Zellen in Bierwürze sich einstellt, sind durch E. Chr. Hansen (4) 15 für elf verschiedene Saccharomyceten festgestellt worden. Und zwar die obere Grenze: für *Sacch. Past. I* bei 34° C, für *Sacch. membranaefaciens, S. Ludwigii* und Wortmann's Weinhefe *Johannisberg II* bei 37 bis 38° C, für *S. cerevisiae I, S. Past. II* und *S. ellips. II* bei 40° C, für *S. ellips. I* bei 40—41° C und für *S. Marxianus* bei 46—47° C. Und die 20 untere Grenze: für *S. cerevisiae I* und *S. membranaefaciens* bei + 3° bis + 1° C, für *S. anomalus* bei + 1 bis + 0,5° C und für die acht übrigen Arten bei + 0,5° C. Eine Vergleichung dieser Zahlen mit den Angaben der Tabelle bei S. 32 wird zu der schon auf S. 25 gemachten Bemerkung führen, daß die Grenzen der Temperatur für die Sproßbildung 25 etwas weiter sind als die für die Sporenbildung, vorausgesetzt, daß jene in Würze verlaufen kann. Läßt man hingegen die Zellen in Wasser aussprossen, so verringern sich um etwas die Werte für die Maxima und steigen etwas jene für die Minima. *Saccharomycopsis guttulatus* sproßt nur bei 37° C.

30 Den Einfluß der Temperatur auf die **Generationsdauer** hat zuerst Rasmus Pedersen (1) einer genaueren Prüfung unterzogen, nachdem zuvor schon durch Pasteur u. a. einige gelegentliche Beobachtungen mitgeteilt worden waren. Mit einer untergärigen Bierhefe in ungehopfter Würze von 16,2° Balling arbeitend, befand jener für den Verlauf der 35 Entwicklung während der ersten 24 Stunden die Generationsdauer zu 20 Stunden bei 4° C, zu 10,5 St. bei 13,5° C, zu 6,5 St. bei 23° C, zu 5,8 St. bei 28° C, zu 9 St. bei 34° C und keine Sprossung bei 38° C. Das den Geringstwert der Generationsdauer ermöglichende Optimum der Temperatur lag also bei diesem Versuche zwischen 28 und 34° C. 40 Später hat dann D. P. Hoyer (1) eine umfassendere Prüfung auf die Weise angestellt, daß er die in entsprechend stark verdünnter Aufschwemmung verteilten Zellen in geringer Anzahl auf einer dünnen Schichte von erstarrter Würzegelatine festlegte, welche an der Unterseite des Deckglases einer Böttcher'schen Kammer aufgetragen worden 45 war. Die der unmittelbaren Beobachtung und Auszählung zugänglichen Präparate wurden durch eine bestimmte Zeit bei der gewählten Temperatur gehalten. Hierauf wurden die inzwischen entstandenen Zellen gezählt und daraus mit Hilfe der oben erwähnten Formel die Generationsdauer berechnet. Diese ergab sich so bei 13° C: für *Sacch. Pastorianus I* 50 Hansen zu 6 St. 6 Min., für *S. Past. II* zu 8 St. 45 Min., für *S. Past. III* zu 8 St. 39 Min., für *S. ellipsoideus I* zu 9 St. 4 Min., für *S. ellips. II* zu 8 St. 49 Min., für *S. anomalus* zu 5 St. 12 Min., für *S. Ludwigii* zu 8 St. 10 Min. und für *S. membranaefaciens* zu 7 St. 1 Min., weiter für

Hefe *Saaz* zu 7 St. 48 Min., für Hefe *Frohberg* zu 7 St. 21 Min., für einen *Sacch. apiculatus* zu 4 St. 45 Min. u. s. f. Hingegen wurde bei 25° C die Generationsdauer befunden: für *S. Past. II* zu 5 St. 12 Min., für *S. Past. III* zu 6 St. 8 Min., für *S. ellips. I* zu 6 St. 12 Min. und für *S. ellips. II* zu 6 St. 9 Min., für *S. membranaefaciens* zu 5 St. 13 Min., 5 für Hefe *Saaz* zu 4 St. 23 Min., für Hefe *Frohberg* zu 4 St. 18 Min. Mit der Entstehung neuer Zellen parallel geht die Verarmung des Nährbodens an notwendigen Baustoffen und dessen Anreicherung mit entwicklungshemmenden Stoffwechselprodukten. Beide Einflüsse werden in einem wärmer gehaltenen Nährboden viel rascher anwachsen und also 10 viel früher und bald so stark sich geltend machen, daß die Vermehrungsgeschwindigkeit noch unter jenen Wert hinuntersinkt und umgekehrt die Generationsdauer über jenen Wert hinaus ansteigt, welchen sie bisher in beträchtlich kühler gehaltenen Zuchten aufgewiesen hat. So sind in den durch PEDERSEN angestellten, oben zum Teil schon be- 15 sprochenen Versuchen während des zweiten Tages als Werte für die Generationsdauer gefunden worden: abermals 20 St. bei 4° C, hingegen 16,7 St. bei 13,5° C und 65,5 St. bei 23° C. In dem von dem Einflusse des Alkoholes auf das Hefenleben handelnden Paragraphen des folgenden (6.) Kapitels wird in dieser Hinsicht noch einiges nachzutragen sein. 20 Bei Temperaturen, welche fast an die Grenzen hinanreichen, jenseits welcher die Sprossung nicht mehr einzutreten vermag, wird die Vermehrungsgeschwindigkeit eine so sehr geringe sein, daß sie der Praktiker vom Standpunkte seiner Ansprüche aus gleich Null erachtet. So hat auch H. MÜLLER-Thurgau (2) bemerkt, daß die durch ihn daraufhin 25 geprüften Weinhefen bei 40° C sich nicht vermehrten. In südlichen Gegenden, in denen zur Zeit der Lese eine diesem Wärmegrade nahe Temperatur herrscht, so z. B. schon in Südfrankreich zufolge KAYSER und BARBA (1), wird man den Most künstlich kühlen müssen, widrigenfalls die darin vorhandenen Hefenzellen nur sehr träge sich vermehren, 30 also auch nur schwache Gärung zustande bringen. Diese reicht dann nicht aus, um allerlei andere beigesellte Störungserreger niederzuhalten. In den nördlichen Weinbaugebieten wieder nähert sich die Temperatur des Herbstes nicht selten der unteren Grenze, bei welcher die Weinhefen sich noch vermehren. Der gekelterte Most gerät in solchem Falle 35 nur sehr spät und langsam in Gärung. Ueber die Maßnahmen, welche der Winzer zu treffen hat, um derartigen Störungen vorzubeugen, spricht das 16. Kapitel des V. Bandes.

In den Bierbrauereien mit untergäriger Hefe stellt man die Würze bei 5 bis 7,5° C an und läßt die Temperatur während der Hauptgärung 40 bei böhmischen Bieren nicht über 9,0° C, bei Wiener Bieren nicht über 9,5° C und bei bayrischen Bieren nicht über 10,5° C hinaus ansteigen. Man verbleibt also die ganze Zeit hindurch weit unter der für die rascheste Zellvermehrung günstigsten Temperatur. Bei Anwendung der üblichen Menge von Aussaat („Stellhefe"), das ist, in dickbreiigem Zu- 45 stande gemessen, ungefähr 0,5 Liter pro Hektoliter Würze, gerät die Flüssigkeit bald in Gärung. Wenn hingegen der Brauer durch irgend welche Umstände einmal in die Lage gerät, die gewohnte Menge Gebräu mit einer viel geringeren Menge von Hefe fertig zu bringen, dann setzt er diese nicht unmittelbar in Tätigkeit, sondern läßt sie zuvor einen 50 Vermehrungsvorgang durchmachen, welcher als Herführen (s. 6. Kap. d. V. Bds.) bezeichnet wird. Dieser Kunstgriff besteht im wesentlichen darin, daß man die verfügbare Anstellhefe mit einem nur auf 15—20° C

hinabgekühlten Teile der zu vergärenden Würze anstellt und bei dieser Temperatur hält. Die Zellvermehrung tritt sehr bald und reichlich ein, so daß nach wenigen Stunden mit dieser inzwischen in beginnende Kräusenbildung eingetretenen Zucht dann die bis dahin bei der üblichen Anstelltemperatur gehaltene Hauptmenge der Würze angestellt werden kann.

Ueber den Einfluß der Temperatur auf das Vermehrungsvermögen liegen außer den Angaben der bisher genannten Forscher auch Befunde vor, welche A. L. Stern (1) erhalten hat. Die von ihm daraufhin geprüfte Burton-Hefe lieferte, in einer mit Dextrose und Asparagin versetzten Mineralsalz-Nährlösung gezüchtet, die höchste (mittelst der Wage bestimmte) Erntemenge bei einer Temperatur zwischen 21° und 25° C.

Der Einfluß der **Beschaffenheit des Nährbodens** auf das Vermehrungsvermögen ist durch eine Reihe von Feststellungen dargelegt worden. Was vor allem die Art der Stickstoffquelle betrifft, so hat Fr. Hess (1) die Ueberlegenheit des Hefenwassers gegenüber einer Asparagin-Mineralsalz-Nährlösung und einer Pepton-Mineralsalz-Nährlösung von annähernd gleichem Gehalt an Stickstoff (9,0 bez. 8,2 und 8,5 mg pro 100 ccm) und Zucker durch nachfolgende Versuchsergebnisse veranschaulichen können, welche die in je 100 ccm dieser Flüssigkeiten binnen 28 Tagen zustande gekommene Zellvermehrung, bezogen auf eine Zelle der (20 Zellen pro cmm betragenden) Aussaat, angeben.

Stickstoff-Nahrung	Vermehrungsvermögen bei Hefe		
	Saaz:	*Frohberg:*	*Logos:*
Asparagin	536	601	645
Pepton	704	1580	2037
Hefenwasser	1529	1659	3608

Zu einem im wesentlichen gleichen Ergebnis ist auch C. Soldan (1) gelangt. Ueber die einschlägigen Befunde von P. Thomas (1) und A. L. Stern (1) war schon auf S. 103 die Rede. Aber auch die Art der Kohlenstoffquelle ist von Einfluß. C. Soldan hat dafür Belege erbracht. Das höchste Vermehrungsvermögen zeigten die Hefen *Saaz*, *Frohberg* und *Logos* dann, wenn dem Nährboden (Hefenwasser oder Asparagin-Mineralsalzlösung) Maltose als Kohlenstoffquelle zugesetzt worden war. Eine mittelgroße Ernte wurde durch Dextrose geliefert. Hingegen erwies sich die Saccharose in dieser Hinsicht als am wenigsten nützlich.

Den Einfluß der **Konzentration** des Nährbodens auf das Vermehrungsvermögen hatte R. Pedersen (1) auf Grund einiger Beobachtungen für gering erklären zu dürfen gemeint. Eingehender hat im Jahre 1887 sich J. Archleb (1) mit dieser Frage befaßt. Er bot der dazu verwendeten Preßhefe (1 g pro l) verschieden starke Auflösungen von Malzextrakt, und zwar von 1 bis 25 Proz. Die Höchstmenge an Hefenernte lieferte die Nährlösung mit einem Gehalte von 14 Proz. Die durch A. J. Brown (1) bei 20° C in gehopfter Ale-Würze von verschieden starker Konzentration angelegten Zuchten einer Oberhefe vom Burton-Typus zeigten kein weiteres Steigen der Erntegröße, wenn man über die Konzentration von ca. 15 Proz. Balling hinausging. A. L. Stern (1), welcher seine Burton-Hefe in zwei Reihen von Versuchen sich in einer mit je gleich viel Asparagin (3 g und 1,5 g pro l) aber mit verschieden großen Mengen von Dextrose (0 bis 30 Proz.) versetzten Mineralsalz-Lösung entwickeln ließ, konnte die Höchstmenge an Hefenernte in den

Proben mit 15 Proz. Zucker in der einen und mit 12,5 bis 15 Proz. in der anderen Reihe feststellen. Auch die durch Emil Bauer (1) angestellten Versuche haben erkennen lassen, daß, von der überhaupt notwendigen Menge aufsteigend, ein Uebermaß an Stickstoffnahrung (und zwar ebensowohl in Gestalt einer Hefenauskochung als auch eines durch Selbstverdauung von Hefe gewonnenen Produktes) ohne Einfluß auf die Menge des Hefenzuwachses war.

In Nährlösungen, welche sehr reich an Zucker sind und dadurch stark plasmolysierend auf die Zellen einwirken, wird die Vermehrung der Zellen erschwert oder sogar ganz behindert sein. Die Küchenkunst macht von diesem Verhalten sehr gerne Gebrauch, wenn es sich um die Haltbarmachung von Obst (Aprikosen, Preiselbeeren etc.) handelt (s. 4. Kap. d. V. Bds.). Allgemein gültige Angaben über die Größe des vermehrungshemmenden Gehaltes an Zucker lassen sich nicht geben, weil sich zum plasmolysierenden Einflusse dieses letzteren jener aller übrigen Stoffe der Nährlösung hinzugesellt. In den durch Em. Laurent (1) an einer Reihe von Bierhefen und Weinhefen vorgenommenen Versuchen trat eine merkliche Vermehrung der Zellen nicht mehr in jenen Zuchten ein, deren Nährlösung (Malzkeime-Abkochung) pro 100 ccm ungefähr 60 g Saccharose oder Invertzucker oder Dextrose oder Maltose enthielt. Noch widerstandsfähiger in dieser Richtung ist der *Saccharomyces Zopfii*. Die durch E. Dubourg (1) aus süßen Weißweinen der Sauterne abgeschiedenen Hefen vermochten noch in 80-proz. Invertzuckerlösung sich zu betätigen. Die durch Ad. Mayer (1) aufgestellte Behauptung von der Möglichkeit der Milderung der plasmolysierenden Einwirkung eines hohen (30-proz.) Zuckergehaltes durch Zusatz von einigen Prozenten Seignettesalz, dank welchem in dem bis dahin stillen Nährboden bald üppige Zellvermehrung und kräftige Gärung eintrete, ist durch M. Hayduck und M. Delbrück (1) widerlegt worden. Hefen von großer Widerstandsfähigkeit gegen hohen Gehalt des Nährbodens an Zucker und anderen Bestandteilen spielen bei der (durch spontane Gärung durchgeführten) Bereitung des unter den Namen Spruce Beer und Black Beer hauptsächlich nach England ausgeführten Danziger Jopenbieres eine Rolle, wie durch P. Lindner (4) dargetan worden ist: er hat aus gärender Jopenwürze, die eine Anfangskonzentration von 53—54 Graden Balling zeigt, zwei neue Hefenarten, *Saccharomyces farinosus* und *Sacch. Bailii*, abgeschieden. Man vergleiche auch die Bemerkung auf S. 89.

Der Grad der Durchlässigkeit der Zellmembran nimmt gleichfalls Einfluß auf die Vermehrungskraft. Er ist nun aber nicht bloß bei verschiedenen Rassen verschieden groß, sondern selbst bei Zellen ein und derselben Rasse veränderlich und durch mancherlei Momente bestimmt, so insbesondere durch das Alter der Zellen und die Art ihres Vorlebens. Darum sind selbst unter gleichen äußeren Bedingungen sowohl Vermehrungsgröße als auch Vermehrungskraft je nach der **Species** (bez. **Rasse**) verschieden. P. Lindner (3 u. 5) hat zuerst im Jahre 1889 darüber vergleichende Untersuchungen an 22 Bierhefen und 15 Weißbier-, Spiritus- und Preßhefen angestellt. Jene lieferten, in je 650 ccm gehopfter Würze von 11,95° Balling ausgesät, Erntemengen von 4,3 bis 12 g in gepreßtem Zustande gewogen, die der zweiten Gruppe in 1350 ccm Würze 9,3 bis 19,5 g. Die Weißbierhefen gaben die höchsten Erträge. Ihnen schließen sich dann absteigend die Preßhefen an. F. Schönfeld (2), wie auch C. Soldan (1), Fr. Hess (1), Roderich

Meissner (1), G. Korff (1), W. Knecht (1) u. A. haben weitere neue Beiträge zur Kennzeichnung jener Abhängigkeit erbracht.

Der Einfluß des **Alters der Aussaat** sowohl auf das Vermehrungsvermögen als auch auf die Vermehrungskraft ist durch M. Elliesen 5 (1) an den Hefen *Frohberg* und *Logos* geprüft worden. Einige der erhaltenen Befunde seien nachstehend wiedergegeben.

Alter der Zellen der Aussaat:	Vermehrungsvermögen in 42 Tagen bei 6—8° C:		Vermehrungskraft binnen 8 Tagen bei 6—8° C:	
	Frohberg	Logos	Frohberg	Logos
24 Stunden:	2880	6400	144	320
3 Wochen:	800	3200	40	160
8 Wochen:	1200	720	60	36

Mit steigendem Alter büßt die Zelle nicht bloß an Lebenskraft sondern auch an Vermehrungskraft ein. Die nach und nach eintretende Verdickung der Zellmembran ist wohl eine gute Wappnung gegen üble Ein-10 flüsse seitens eines zum Ungünstigen geänderten Nährbodens; sie wird aber in gleich steigendem Maße zum Hindernisse, durch welches hindurch die aneifernden Bestandteile eines neuen Nährbodens vordringen müssen, wenn die Aussaat sich vermehren und also Stoffansatz vornehmen soll. Das weit höhere Vermehrungsvermögen der nur 24 Stunden alten Aus-15 saat in obiger Zusammenstellung ist demnach gar nicht überraschend.

Der Einfluß der **Größe der Aussaat** auf die **Größe der Ernte**, welche in einem Nährboden von gegebener Menge und Beschaffenheit heranzuwachsen vermag, ist für die Gärungstechnik von Bedeutsamkeit, und zwar nicht bloß für den Hefenfabrikanten sondern auch für den Brauer und 20 den Winzer. Die ersten zuverlässigen Ermittlungen hierüber unter den Verhältnissen des praktischen Betriebes verdanken wir Thausing (1). Dieser hat in vier österreichischen Brauereien (A bis D) gleichartige Parallelversuche anstellen lassen, wobei die Würze pro Hektoliter mit 0,33, bzw. 0,5 und 0,66 Liter dickbreiiger untergäriger Hefe angestellt wurde. Die 25 gewonnenen Befunde sind zu nachstehender Tabelle rechnerisch verarbeitet worden. Sie gibt für jede der vier Brauereien zunächst an, auf welche absolute Erntemenge sich die entsprechende Aussaat vermehrt hat. Die Differenz dieser beiden Zahlen (Ernte minus Aussaat) gibt den eingetretenen Zuwachs an.

Pro hl Würze ausgesät dickbreiige Hefe l:	Daraus erzielte Ernte (l) dickbreiiger Hefe:				Zuwachs (l) dickbreiiger Hefe:			
	A	B	C	D	A	B	C	D
0,33	1,63	1,99	1,74	1,49	1,30	1,66	1,41	1,16
0,50	1,61	1,95	1,95	1,50	1,10	1,45	1,45	1,00
0,66	1,66	1,83	1,79	1,53	1,00	1,21	1,13	0,87

30 Man ersieht aus der Tabelle, daß eine Steigerung der Größe der Aussaat keine oder nur geringe Erhöhung der Ernte, wohl aber merkliches Sinken der Größe des Zuwachses zur Folge hatte. Diese Tatsache ist dann wiederholt bestätigt worden, so im Jahre 1889 durch O. Reinke (1) an untergäriger Bierhefe, in den Jahren 1890 und 1892 durch A. J. Brown 35 (1 u. 2) an einer Oberhefe vom Burton-Typus, im Jahre 1897 durch Thausing selbst durch neue Versuche und in demselben Jahre durch

Alb. Reichard und Alb. Riehl (1) in der untergärigen Brauerei zu Lutterbach im Elsaß und durch die Bierbrouwery d'Oranjeboom (1) in Rotterdam. Durch letztere ist auch, in Uebereinstimmung mit Thausing's Befunden, dargetan worden, daß die Höhe der Temperatur ohne Einfluß auf die Gültigkeit jener Feststellung ist. Denn das Endergebnis war im wesentlichen das gleiche, ob man die Gärung sehr kalt führte und also bei 3.8° C anstellte, auf 9.4° C steigen ließ und dann auf 6° C hinabdrückte, oder ob man sehr warm führte und also die Temperatur von anfänglich 10.1° C über 15.8° C zu 10° C zurückleitete, oder schließlich, ob man unter den gewöhnlich eingehaltenen Normen von 8° C bzw. 8.8° C und 11° C arbeitete. In der Praxis der untergärigen Brauerei gibt man pro Hektoliter Anstellwürze meist 0.5 l dickbreiige Hefe, also 50 l pro 100 hl, und sagt in solchem Falle, allerdings unrichtig aber allgemein, man arbeite mit „fünfzigprozentiger Hefengabe". Jenes halbe Liter untergäriger Anstellhefe wächst dann zu ungefähr 4 l Satzhefe heran. Das Dépôt als welches sich diese am Grunde der Gärbottiche vorfindet, ist aus drei Schichten aufgebaut: zu unterst die Bodenhefe, dann die Kernhefe und zu oberst der Oberzeug. Nur der mittlere Anteil wird für die Zwecke der Brauerei weiter verwendet und also sorgfältig von den zwei anderen abgetrennt. Er macht ungefähr 60 Proz. des Gesamtdépôts aus und verringert sich noch bei dem darauf folgenden Waschen, so daß man also aus 0.5 l Anstellhefe ungefähr 1 l Samenhefe wiedergewinnt. Man braucht davon für die Anstellung eines folgenden Gebräues nur die Hälfte. In betreff der Verwertung der anderen Hälfte sei auf das 5. Kapitel des V. Bandes verwiesen.

§ 26. Der Sauerstoffverbrauch für die Zwecke der Zellvermehrung und der Atmung.

Die Frage, ob es unter den Hefen strenge Anaeroben (s. Bd. I, S. 313) gebe, und ob also Zellvermehrung auch bei vollkommenem Ausschluß von freiem Sauerstoff sich unbeschränkt weit abspielen könne, vermag man derzeit noch nicht endgültig zu beantworten. J. Behrens (1) gibt an, daß er auf Hopfendolden verhältnismäßig viel anaerobe Hefen vorgefunden habe. Traube (1) hatte früher schon dargetan zu haben gemeint, daß Hefenentwicklung unter gewissen Voraussetzungen auch bei Sauerstoffausschluß eintrete. Brefeld (1) hingegen glaubte zu dem Beweise der Unentbehrlichkeit des Sauerstoffes für die Hefenzellvermehrung gelangt zu sein. G. Korff (1) hat in Zuchten, welche in einem mit 10 Proz. Saccharose versetzten Hefenwasser angelegt, mit Wasserstoff ununterbrochen durchspült und mit einer unter gleichen Bedingungen herangewachsenen Aussaat beimpft worden waren, beträchtliche Zellvermehrung beobachtet. Die binnen 14 Tagen entstandene Erntemenge betrug pro eine Zelle der Aussaat: bei Hefe *Saaz* 876, bei Hefe *Frohberg* 1346, bei Hefe *Logos* 1160 Zellen. P. Barker (1) zufolge soll bei einem durch ihn von Ingwer abgeschiedenen Saccharomyceten bei vollkommenem Ausschluß von freiem Sauerstoff das Wachstum oder wenigstens dessen Beginn ausbleiben.

Mit der Zunahme der Schärfe unserer Kritik an der Zuverlässigkeit der zur Schaffung von wirklich anaeroben Lebensbedingungen bisher verwendeten Verfahren und Hilfsmittel (s. 23. Kap. d. I. Bds.) verringert sich das Vertrauen in die Ergebnisse gar mancher der zur Lösung der

Frage von der Anaerobiose angestellten Versuche und erhebt sich immer deutlicher der Zweifel, ob dieser oder jener Anaerobe wirklich streng anaerob oder vielleicht bloß ein Aerobe von sehr geringem Sauerstoffbedürfnisse sei (s. Bd. I, S. 328). Es möge nur an die eine Schwierig-5 keit erinnert werden, welche darin liegt, das zur Verdrängung der Luft und zur Durchspülung der Zuchten zu verwendende Gas (Wasserstoff, Stickstoff, Kohlensäure) wirklich ganz von Sauerstoff zu befreien. Der Mangel dieser Voraussetzung wird aber dann entscheidend sich geltend machen, wenn es sich um Lebewesen handelt, welche gegen Sauerstoff 10 sehr empfindlich sind und schon durch geringe Mengen dieses Gases angeregt werden. Die Hefe ist nun aber gerade von solcher Art. Sie begnügt sich schon mit einer Tension, welche dem Verhältnisse von ein Teil Sauerstoff in 6000 Teilen Kohlensäure entspricht, wie Brefeld (1) bemerkt hat. Traube's Gegenbeweis mit Hilfe von Indigschwefelsäure 15 ist nicht einwandfrei. Unzureichend ist der schon mehrmals geführte Nachweis, daß Hefen bei kurzweiligem Abschluß von Sauerstoff sich vermehren. In solchem Falle zehren sie wohl von dem aufgespeicherten Vorrate. Und als Zuchten, welche bei Abwesenheit von Sauerstoff sich entwickeln, können selbstverständlich auch nicht solche gelten, bei denen 20 das Gefäß einen mit verdünnter Schwefelsäure beschickten Gärverschluß trägt. E. Chr. Hansen (4) gibt kurz an, daß in seinen Versuchen mit sauerstofflosem Stickstoff die Sprossung eingetreten sei, die sich also auch darin scharf von der Sporenbildung unterscheide, welch letztere ja nur bei reichlichem Zutreten von Sauerstoff sich abspielt (vgl. S. 25).

25 Tatsache ist, daß das Wachstum und die Vermehrung der bisher geprüften Hefen in **gelüfteten Zuchten** viel freudiger ist. Die ersten zuverlässigen (weil mit der Zählkammer angestellten) Ermittlungen darüber verdanken wir E. Chr. Hansen (6), welcher im Jahre 1879 an einer Bierhefe gezeigt hat, daß diese, in Würze bei 12—14° C gehalten, 30 binnen 60 Stunden pro eine Zelle ohne Lüftung auf 11.2 Zellen und mit Lüftung auf 35.8 Zellen sich vermehrte. In einem zweiten Versuche bei 13—16° C ergaben sich die Erntemengen von 9 gegen 27.3 Zellen auf je eine Zelle der Aussaat. Andere Forscher sind später zu ähnlichen Ergebnissen gelangt. Die durch N. von Chudiakow (1) ausgesprochene 35 Behauptung, daß nur in schlecht nährenden Mitteln der Sauerstoff für die Vermehrung der Hefe unentbehrlich sei, erscheint nicht ausreichend genug begründet. Die Stärke der Anregung, welche die Zellvermehrung durch das Lüften erfahren kann, hängt unter sonst gleichen Bedingungen von der Art (Rasse) der Hefe ab, wie durch eine Reihe von Forschern, 40 so auch durch G. Korff (1) und M. Delbrück (1), bemerkt worden ist. Die größere Freudigkeit der Vermehrung in einer gelüfteten Zucht ist jedoch, wie Prior (1) dargelegt hat, nicht allein dem Ueberschuß an verfügbarem freien Sauerstoff sondern auch dem nicht zu unterschätzenden Umstande zu verdanken, daß durch das den Nährboden hindurchstreichende 45 Gas aus diesem mancherlei entwicklungshemmende Stoffwechselprodukte der Hefe (flüchtige Säuren) fortgeführt werden.

Die Hefe hat die Fähigkeit, freien Sauerstoff aus der Umgebung aufzunehmen, zur Vollziehung des Stoffumsatzes zu verwenden und dann meist in Gestalt von Kohlensäure wieder auszustoßen. Eine nähere Be-50 trachtung dieses Atmungsvorganges ist nicht ohne Ausbeute an neuer Erkenntnis. Die Menge an Sauerstoff, welche von den Hefenzellen aufgenommen werden kann, ist in einem durch P. Schützenberger und E. Quinquaud (1) angestellten Versuche, in welchem eine Preßhefe (von 26 Proz.

Trockengehalt) in lufthaltigem Wasser verteilt worden war, ermittelt worden, und zwar pro 1 g Hefe und 1 Stunde bei 9° C zu 0,1 ccm, bei 11° C zu 0,4 ccm, bei 22° C zu 1,2 ccm, bei 33° C zu 2,1 ccm, bei 40° C zu 2,1 ccm, bei 50° C zu 2,4 ccm, bei 60° C zu 0,0 ccm Sauerstoff. Diesen Forschern zufolge sollen angeblich nicht mehr als die eben zuvor angeführten Mengen von Sauerstoff auch in jenen Fällen aufgenommen werden, in denen das umgebende Mittel nicht, wie jenes Wasser, pro Liter bloß 6 oder 7 ccm Sauerstoff sondern, wie z. B. arterielles Blut, 200—230 ccm Sauerstoff abzugeben hat. Diese Behauptung ist nur unter den durch diese zwei Forscher gebotenen Versuchsbedingungen zutreffend. Unter anderen Verhältnissen arbeitend, haben A. Harden und S. Rowland (1) an der von ihnen verwendeten Preßhefe pro 1 g eine mittlere stündliche Aufnahme von 3,74 ccm des in Rede stehenden Gases beobachtet. Die Größe des Sauerstoffverbrauches wird voraussichtlich dann sehr hoch ansteigen, wenn die Zellen nicht, wie in diesem Falle, von sich selber zehren müssen, sondern reichliche Mengen von veratembaren Substanzen zur Verfügung haben. Und tatsächlich ist auch durch Giltay und Aberson (1) beobachtet worden, daß die in einem mit Zucker versetzten Nährboden gehaltene Hefe um so mehr von jenem veratmete (verbrannte), je stärker gelüftet wurde und je reicher das durchgeleitete Gemisch von Luft und Sauerstoff an diesem zweiten Bestandteile war. Der darauf zurückzuführende Abgang konnte bis zu 21 Proz. der Gesamtmenge des (für Zellaufbau, Atmung und Gärung verwendeten) Zuckers steigen. Die höhere End-Attenuation (s. 6. Kap. d. V. Bds.) der während der Gärung stärker gelüfteten Würzen ist zum Teil auf die erhöhte Atmung zurückzuführen.

Ueber die **Abhängigkeit der Atmung** der Hefen von den äußeren Bedingungen liegen bisher nur wenige vertrauenswürdige Untersuchungen vor. Seitdem wir wissen, daß die Alkoholgärung der Hefen eine reine Enzymwirkung (s. d. 17. Kap.) ist, welche mit dem Leben der Zelle selbst nicht unmittelbar und nicht untrennbar zusammenhängt, müssen wir auf die Zwiefältigkeit der Quellen der Kohlensäureentwicklung achten und also Atmung und Gärung wohl auseinander halten. Die Beeinflußbarkeit der Atmung läßt sich darum, strenge genommen, nur unter solchen Versuchsbedingungen ungetrübt prüfen, welche durch die Art der verwendeten Hefe und die Beschaffenheit des Nährbodens das Eintreten von Alkoholgärung von vornherein ausschließen. Durch diese Erkenntnis hat aber auch mit einem Schlage eine ansehnliche Reihe von Experimentaluntersuchungen betreffend Kohlenstoffbilanz der Alkoholgärung, die Förderung dieser durch die Lüftung u. a. m. so gut wie allen Wert eingebüßt. Ueber die Zwischenstufen der Verbrennung, welche die der Veratmung unterworfenen Substanzen durchlaufen, wissen wir sehr wenig. Der durch W. Zopf (1) aus amerikanischem Baumwollsaatmehl reingezüchtete *Saccharomyces Hansenii*, der zur Erregung von Alkoholgärung unfähig ist, bildet reichliche Mengen von Oxalsäure (vgl. Bd. I, S. 317), welche man wohl als das Ergebnis einer schon bei dieser Säure und nicht erst bei der Kohlensäure zum Abschluß gelangenden Oxydation der in der Nährlösung gebotenen Zuckerarten (Glucose, Galactose, Saccharose, Maltose, Lactose, wie auch Mannit, Dulcit, Glycerin) betrachten darf. Durch mehrere Forscher, so insbesondere durch E. Prior (1), ist festgestellt worden, daß in sehr reichlich gelüfteten Hefenzuchten größere Mengen von Säuren entstehen als in mäßig gelüfteten. Inwieweit sie als Produkte der rein chemischen

Einwirkung des Sauerstoffes auf Bestandteile des Nährbodens und inwieweit sie als Ergebnisse des durch das starke Lüften überreizten Stoffwechsels der Hefe zu deuten sind, bleibt noch näherer Untersuchung überlassen. Zufolge der durch G. KORFF (1) an den Hefen *Saaz*, *Frohberg* und *Logos* angestellten vergleichenden Versuche soll in den gelüfteten Zuchten ein höherer Gehalt an fixen Säuren, hingegen in den mit Wasserstoff durchspülten mehr von flüchtigen Säuren zustande kommen. Man erinnere sich hier auch des auf S. 18 erwähnten Unterschiedes im chemisch-physiologischen Verhalten der Zellen der Bodensatzhefe einerseits und jener der Hautbildungen andrerseits. Die Art der Abhängigkeit des Atmungskoeffizienten (s. Bd. I. S. 319) der Hefen von den äußeren Bedingungen ist bisher noch nicht genügend erforscht. Die Wärmemenge, welche durch die Atmung frei wird, kann unter günstigen Umständen eine beträchtliche Temperatursteigerung herbeiführen. Diese betrug in einem durch EFFRONT (1) beobachteten Falle, in welchem 2 kg Preßhefe in zerkleinertem Zustande in 37 cm hoher Schichte bei 20° C der Luft ausgesetzt waren, binnen 3 Stunden 36° C.

Die **Nützlichkeit des Lüftens** des Nährbodens für die Entwicklung der darin zu züchtenden Hefe ist in der Praxis der Gärungstechnik ein schon seit langem feststehender Erfahrungssatz. Ueber die Ausführung im großen Betriebe wird im V. Bande noch die Rede sein, so insbesondere in betreff der Bierwürze im ersten Paragraphen des 6. Kapitels. Die Würze nimmt hauptsächlich in jenem ersten Zeitabschnitte des Lüftens, in welchem sie noch sehr heiß ist, reichlich Sauerstoff auf, welcher chemisch gebunden wird und zum Teil in Gestalt von Kohlensäure darin verbleibt. Später dann, bei gesunkener Temperatur, wird eine beträchtliche Menge jenes Gases auch noch physikalisch festgehalten (gelöst). PASTEUR (1) hat in einem Versuche die erstere Menge zu 41,7 ccm und die letztere zu 7 ccm im Liter Würze ermittelt. P. PETIT (1) befand diese in einem Versuche beträchtlich geringer, nämlich nur zu 5,7 ccm. A. PETERSEN (1) hat den Sauerstoffgehalt der Würze der Alt-Carlsberger Brauerei zu 2—4 ccm pro Liter bestimmt. C. BLEISCH und R. SCHWEITZER (1) schließlich haben bei ihren eingehenden Untersuchungen über die Abhängigkeit der Größe der Sauerstoffaufnahme von der Temperatur der Würze, von deren chemischen Beschaffenheit, Gehalt und Bewegungszustand für die Menge des physikalisch gelösten Sauerstoffes die Werte von 2,4 ccm (bei 62,5° C) und 4,4 ccm (bei 5° C) und für den chemisch gebundenen Anteil hingegen die Werte von 53 ccm (bei 85° C) und 4 ccm (bei 45° C) pro ein Liter einer Würze von 14,4 und 14° Balling erhalten. Die zersetzende Einwirkung des Sauerstoffes ist bei mittlerer (15° C) Temperatur zwar recht sanft, vermag aber doch, wenn sie lange andauern kann, sich geltend zu machen. In dieser Hinsicht sei hier noch auf das von RAÝMAN und KRUIS (1) beobachtete Auftreten von Ameisensäure (neben Kohlensäure) in einer dem Luftzutritte zugänglichen sterilen Würze von höherem Alter hingewiesen.

Die Lufthefenfabrikation, das zweite und neuere der beiden Verfahren (s. 10. Kap. d. V. Bds.) zur Herstellung von Preßhefe, ist auf die Beobachtung der Begünstigung der Zellvermehrung durch kräftiges Lüften gegründet. Es stammt aus Schweden. Den ersten Anstoß dazu haben wohl M. HAYDUCK's (1) Versuche gegeben, welche durch M. DELBRÜCK (1) dann weiter verfolgt worden sind. Dank jenem fördernden

Einflusse des Sauerstoffes ergibt das Lüftungsverfahren eine Ausbeute an Preßhefe von 25—30 kg aus 100 kg Maischmaterial (Cerealien), gegenüber ungefähr 12 Proz. nach dem alten Verfahren, und verdrängt darum dieses nach und nach.

Bei der Züchtung von Hefe in einem Laboratorium für den Bedarf 5 der Technik darf auf das Lüften des Nährbodens nicht vergessen werden. Denn soweit Brauereihefe in Betracht kommt, hat HANSEN festgestellt und ALFR. JÖRGENSEN (2) bestätigt, daß eine solche, welche in einer gar nicht oder in einer ungenügend gelüfteten Würze herangewachsen ist, im großen Betriebe dann wenig zufrieden stellen kann, insbesondere 10 keinen schönen Bruch gibt.

Ueber den Einfluß, welchen der Sauerstoff auf den Verlauf der Alkoholgärung zu nehmen vermag, wird im 18. Kapitel zu sprechen sein.

Literatur

zum Kapitel Hefenzüchtung und Hefenvermehrung.

*Archleb, J., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1888, Bd. 11, S. 243. *Barker, P., (1) Ann. of botany, 1900, Bd. 14, S. 215. *Basenau, Fr., (1) Arch. f. Hyg., 1895, Bd. 23, S. 44. *Bauer, E., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1901, Bd. 24, S. 309. *Behrens, J., (1) W. f. Brauerei, 1896, Bd. 13, S. 802 u. 946. *Bierbrouwery d'Oranjeboom, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1897, Bd. 20, S. 423. *Bleisch, C., und Schweitzer, R., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1899, Bd. 22, S. 515. *Brefeld, O., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1874, Bd. 7, S. 281. *Brown, A. J., (1) Transactions of the Laboratory Club, 1890, Bd. 3, S. 64. — (2) Journ. Chemical Society, Transact., 1892, Bd. 61, S. 369. *Chudiakow, N. von, (1) Landw. Jahrbücher, 1894, Bd. 23, S. 391. *Delbrück, M., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1890, Bd. 13, Ergänzungsheft, S. 31. *Dubourg, E., (1) Revue de Viticulture, 1897, S. 467. *Effront, J., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1898, Bd. 127, S. 326. *Elliesen, M., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1901, Bd. 7, S. 497. *Giltay, E., und Aberson, J. H., (1) Archives néerlandaises etc., 1892, Bd. 25, S. 341. *Hansen, E. Chr., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1879, Bd. 1, S. 49 u. 197. — (2) Ebenda, 1883, Bd. 2, S. 13. — (3) Ebenda, 1886, Bd. 2, S. 92. — (4) Ebenda, 1902, Bd. 5, S. 68. — (5) Ebenda, 1898, Bd. 4, S. 93. — (6) Ebenda, 1879, Bd. 1, S. 88. — (7) Unters. a. d. Praxis d. Gärungsindustrie, 1. Heft, 3. Aufl., München 1895. *Harden, A., und Rowland, S., (1) Journ. Chemical Soc. London, 1901, Bd. 79, S. 1227. *Hayduck, M., (1) W. f. Brauerei, 1884, Bd. 1, S. 345. *Hayduck, M., und Delbrück, M., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1880, Bd. 3, S. 214. *Hess, Fr., (1) Vergärung von Saccharose d. d. Hefen Saaz, Frohberg u. Logos unter versch. Ernährungsbedingungen. Dissert. Erlangen 1897. *Holm, J. Chr., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1891, Bd. 2, S. 1. — (2) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1896, Bd. 2, S. 313. *Hoyer, D. P., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1899, Bd. 5, S. 703. *Jörgensen, Alfr., (1) Allgem. Zeitschr. f. Bierbrauerei u. Malzfabr., 1890, Bd. 19, S. 1215. — (2) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1890, Bd. 13, S. 49. *Kayser, Ed., und Barba, G., (1) Bullet. du Ministère de l'Agriculture, Paris 1896; ref. in Kochs Jahresb., 1896, Bd. 7, S. 126. *Klöcker, Alb., (1) D. Gärungsorganismen in d. Theorie u. Praxis d. Alkoholgärungsgewerbe. Stuttgart 1900. *Knecht, W., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1901, Bd. 7, S. 161. *Korff, G., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 465. *Kukla, A., (1) Ber. d. Versuchsanstalt f. Brauerei in Böhmen für 1890. *Lafar, Fr., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1894, Bd. 17, S. 10; 1897, Bd. 20, S. 679. *Laurent, Em., (1) Ann. Soc. belge de Microscopie, 1890, Bd. 14, S. 29. *Lindner, P., (1) W. f. Brauerei, 1893, Bd. 10, S. 1354. — (2) Ebenda, 1894, Bd. 11, S. 697. — (3) Ebenda, S. 381. — (4) Ebenda, S. 153. — (5) Z. f. Spiritusindustrie, 1890, Bd. 13, Ergänzungsheft, S. 29. *Mayer, Ad., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1880, Bd. 13, S. 1163. *Meißner, Roderich, (1) Studien ü. d. Einfluß d. Essigsäure u. Milchsäure auf d. Hefen Saaz, Frohberg u. Logos in Saccharoselösung. Erlangener Dissert., Berlin 1897. *Miquel, P. (1) Mémoire de l'Observatoire de Montsouris pour 1888; ref. in Centralbl. f. Bakt., 1888, Bd. 4, S. 276. *Müller-Thurgau, H., (1) Vierter Jahresb. d. Versuchsstation etc. in Wädensweil pro 1893—94, S. 64. — (2) Bericht etc. d. X. Deutsch. Weinbau-Kongresses zu Freiburg i. B., 1888, S. 94. — (3) Bericht etc. d. XII. D. Weinbau-Kongresses in Worms. Mainz 1891, S. 128. *Pasteur, L., (1) Etudes sur la bière etc. Paris 1876. *Pedersen, R., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1878, Bd. 1, S. 22. *Petersen, A., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1888, Bd. 11, S. 53. *Petit, P., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1894, Bd.

118, S. 1055. ***Preyer,** Axel, (1) D. Tropenpflanzer, 1901, Bd. 5; ref. in Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 715. ***Prior,** E., (1) Chemie u. Physiologie d. Malzes u. Bieres. Leipzig 1896. ***Rayman,** B., und **Kruis,** K., (1) Mitt. d. Versuchsstation f. Spiritusind. zu Prag, 1891, H. 1, S. 3. ***Reichard,** A., und **Riehl,** A., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1897, Bd. 20, S. 8. ***Reinke,** O., (1) W. f. Brauerei, 1889, Bd. 6, S. 569. ***Schönfeld,** Fr., (1) W. f. Brauerei, 1895, Bd. 12, S. 546. — (2) Ebenda, 1896, Bd. 13, S. 421. ***Schützenberger,** P., und **Quinquaud,** E., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1873, Bd. 77, S. 272. ***Soldan,** C., (1) D. Gesamtarbeitleistung der Hefen Saaz, Frohberg u. Logos etc. Erlangener Dissert., Nürnberg 1897. ***Stern,** A. L., (1) Transact. Chemical Society London, 1901, Bd. 79, S. 943. ***Thausing,** J., (1) D. Theorie u. Praxis d. Malzbereitg. u. Bierfabr., 5. Aufl., Leipzig 1898. ***Thomas,** P., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1901, Bd. 133, S. 312. ***Topf,** G., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1888, Bd. 11, S. 285. ***Traube,** M., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1874, Bd. 7, S. 872 u. 1756. ***Will,** H., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1896, Bd. 2, S. 483. — (2) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1900, Bd. 23, S. 748. — (3) Ebenda, 1901, Bd. 24, S. 501. — (4) Ebenda, 1897, Bd. 20, S. 591. ***Zopf,** W., (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1889, Bd. 7, S. 94.

6. Kapitel.

Wirkung einiger technisch wichtiger chemischer Einflüsse auf die Hefen.

§ 27. Das Kupfer und dessen Salze.

In den vorhergehenden drei Kapiteln sind die formalen Bedingungen der Ernährung und der Vermehrung der Hefen dargelegt worden. Es erübrigt nun noch die Besprechung einiger wichtiger störender Einflüsse, 5 denen jene in der freien Natur oder in der Gärungstechnik begegnen. Die Einwirkungen physikalischer Kräfte können hier außer Betracht bleiben, weil sie an anderen Stellen dieses Werkes gewürdigt werden, so die des Lichtes auf S. 453, der Elektrizität auf S. 458 und der mechanischen Erschütterung auf S. 460 des I. Bandes. Der Widerstand 10 gegen Kälte und gegen Hitze und das Ausdauern beim Eintrocknen werden im 5. Kapitel des V. Bandes, in Zusammenhang mit der Besprechung der Haltbarmachung der Hefe für technische Zwecke, ihre Erledigung finden. Ueber die schon auf S. 367 des I. Bandes angedeutete Bildung von Varietäten durch höhere Temperaturen sind im übernächsten 15 Kapitel ausführlichere Angaben zu finden. Auch über jene Beziehungen sehen wir hier hinweg, welche sich in natürlichen oder künstlichen Gemischen zwischen Hefen von verschiedener Art untereinander oder zwischen Hefen und anderen Eumyceten und Schizomyceten geltend machen; denn es ist ihrer nicht bloß schon auf S. 510 des I. Bandes 20 Erwähnung getan worden, sondern es wird im V. Bande auf sie noch oft und von verschiedenen Standpunkten aus einzugehen sein, so z. B. gleich in dessen 6. Kapitel in betreff der Mischsaaten in der Brauerei. In dem vorliegenden Kapitel hingegen handelt es sich nur um Einflüsse chemischer Natur, und wir beginnen beim Kupfer, als demjenigen, auf 25 welchen die Hefe in manchen Fällen zuerst stoßen kann, wenn sie zur Vermehrung oder zur Wirksamkeit gelangen soll.

Das Verhalten der Hefenzellen zum Kupfer und dessen Salzen hat insbesondere für die Praxis der Weinbereitung einiges Interesse. Wie dem Leser wohl bekannt ist, bekämpft man die durch die *Peronospora*

viticola (vgl. Bd. I, S. 205) verursachte und als falscher Mehltau bezeichnete Krankheit der Reben dadurch, daß man sie nach dem Vorschlage von A. MILLARDET in Bordeaux mit der sogen. Bordeaux-Brühe, bouillie bordelaise, bespritzt, das ist eine ungefähr dreiprozentige Auflösung von Kupfervitriol, in welcher das Kupfer durch Zusatz einer 5 äquivalenten Menge von Kalkhydrat in die Form seines Hydroxydes, bzw. in basische Doppelsalze, wie BERLESE und SOSTEGNI (1) gezeigt haben, übergeführt worden ist. Wie die Erfahrung gelehrt hat, gelangt man durch dieses Hilfsmittel zu dem erstrebten Ziele: es werden die Konidien des genannten Pilzes abgetötet und so die Blätter und Beeren 10 dem Rebstocke erhalten. Nun ist aber das Kupfer ein Gift nicht bloß für den Erreger der Blattfallkrankheit sondern auch für andere Pilze, insbesondere die Hefen, so daß also eine solche „Kupferung" auch eine mehr oder minder weit gehende Schädigung der auf den Beeren sitzenden zukünftigen Gärerreger im Gefolge haben kann. Da voraussichtlich die 15 Empfindlichkeit der einzelnen Hefenstämme gegen Kupfer verschieden groß sein wird, so läßt sich vermuten, daß das Kupfern der Reben auch eine Veränderung der Flora der Weintrauben bewirken und so seinen Einfluß bis in das Mostfaß erstrecken wird, und zwar insbesondere stark im Falle eines späten Spritzens. A. ROMMIER (1) hat Moste, welche aus 20 spät gespritzten, edlen Trauben gewonnen worden waren, beobachtet, von denen der eine selbst bei günstiger Temperatur gar nicht in Gärung geriet, während in dem anderen nur lebende Zellen eines (gegen Kupfer vielleicht weniger empfindlichen) *Saccharomyces apiculatus* sich vorfanden, so daß die Vergärung ungenügend blieb. ROMMIER wurde dadurch zur 25 Anstellung einiger Versuche über den Einfluß des Kupfers auf die Hefenzellen veranlaßt. Er fand, daß schon ein Zusatz von 25 mg Cu (= 98 mg kristallisierten Kupfervitrioles) zu einem Liter Most das Eintreten der Gärung verzögert. Im Widerspruch zu dieser Angabe behauptete P. PICHI (1) im Jahre 1891, daß ein Kupferzusatz von weniger 30 als 150 mg zu einem Liter Most ohne schädigenden Einfluß auf die Entwicklung und Gärwirkung der von ihm benützten Art von Weinhefe sei. Beide Forscher hatten jedoch eine von POLACCI gemachte Bemerkung nicht berücksichtigt, der zufolge das in den Most gelangte Kupfersulfat sich mit dem vorhandenen Weinstein zu Kaliumsulfat und un- 35 löslichem (also ausfallendem und außer Wirkung tretendem) Kupfertartrat umsetzt. Dies beachtend wurde dann im Jahre 1894 durch FRIEDR. KRÜGER (1) für eine Reinzucht-Hefe von Schloß Johannisberg festgestellt, daß der höchste (in Lösung vorhandene und also wirksame) Zusatz von Kupfervitriol, welcher pro ein Liter noch ohne merkliche 40 Beeinträchtigung vertragen wird, der Menge von 44 bis 45 mg Cu entspricht. Steigt er, so nimmt die Gärkraft nach und nach ab. Die Entwicklungsfähigkeit und das Gärvermögen wird jedoch nicht so bald vernichtet. In den von H. WILL (1) an untergärigen Bierhefen angestellten Versuchen erwies sich von den durch 24 Stunden in einer 5-proz. Kupfer- 45 sulfat-Lösung gehaltenen Zellen eine beträchtliche Anzahl dann noch kräftig genug, um eine Zuckerlösung, in die sie übertragen wurden, zu vergären.

Der naheliegenden Annahme gegenüber, als sei der von KRÜGER ermittelte Zahlenwert von unbedingter Gültigkeit, muß nun auf die zu- 50 erst von E. BIERNACKI (1) im Jahre 1891 gemachte wichtige Feststellung hingewiesen werden, daß nämlich von einem Antisepticum (also hier insbesondere von Kupfersulfat) verschieden große Gaben nötig sind,

wenn verschieden große Mengen der Aussaat an der Gärtätigkeit eben gehindert werden sollen. Dieser Befund ist wiederholt bestätigt worden, so bei Anwendung von Kupfersulfat durch H. Mann (1), H. Pottevin (1) und A. Amand (1), von Eisensulfat, Bleiacetat und Sublimat durch den Ersteren, von den Arseniten des Kaliums und des Natriums durch C. Wehmer (1), von schwefliger Säure durch Müller-Thurgau (3). Der folgerichtige Verzicht auf die Gewinnung von unbedingt geltenden, festen Grenzwerten auf diesem Gebiete braucht jedoch durchaus nicht von weiterem Forschen abzuhalten. Im Gegenteile, es ist eine vergleichende Untersuchung verschiedener Reinhefen auf ihre Empfindlichkeit sehr erwünscht, insbesondere als Beitrag zur Lösung der praktisch wichtigen Frage nach dem Einfluß des Kupferns der Reben auf die Veränderung ihrer Hefen-Flora.

Der Vollständigkeit halber soll hier noch eine Bemerkung angeschlossen werden, welche sich übrigens auf Grund vorhergegangener Darlegungen (s. Bd. I, S. 344 u. 487) ohne weiteres vorhersehen läßt, daß nämlich auch der Kupfervitriol in Gaben, die weit unterhalb der zuvor berichteten Grenzzahlen liegen, nicht mehr hemmend sondern anreizend und fördernd auf die Gärtätigkeit der Hefenzellen einwirkt. Biernacki zufolge ist dies bei einer Verdünnung von ein Teil Kupfersulfat auf 600 000 Teile Nährlösung der Fall.

Von ganz besonders gearteten Ausnahmsfällen abgesehen, wird der Winzer von dem durch das Spritzen auf die Beeren gebrachten Kupfer keine Störung der Weingärung zu befürchten haben. Wie A. Tschirch (1) berichtet, geht zufolge der Ergebnisse der von Ed. Mach angestellten Untersuchungen, welche durch eine Arbeit von M. Hoffmann (1) über portugiesische Weine eine Ergänzung gefunden haben, nur etwa ein Zehntel des auf den Beeren vorhandenen Kupfers in den Most über, während alles übrige in den Trestern verbleibt. Von jenem Zehntel kommt aber, zufolge der von Polacci gemachten Feststellungen, voraussichtlich wieder nur ein geringer Bruchteil zur Wirkung, so daß also von diesem wohl nicht mehr viel Störung wird angerichtet werden können. Dieser Rest (im Moste noch aufgelöst enthaltenen Kupfers) wird endlich, wie Chuard gezeigt hat, zum größten Teile noch während der Gärung, infolge des Anwachsens des Alkohol-Gehaltes, als Malat und Tartrat ausgeschieden und durch den von den Hefenzellen hervorgebrachten Schwefelwasserstoff (s. S. 87) wohl auch zum Teil in Sulfid übergeführt, sodaß also der fertige und von der Hefe klar abgezogene Wein selbst dann, wenn er von stark gekupferten Beeren herstammt, nur noch wenige Milligramme Kupfer im Liter enthält. In dem Hefentrub hingegen wird sich allerdings dementsprechend mehr vorfinden.

Aus den Ergebnissen der Versuche von H. Mann (1) und H. Pottevin (1) darf man schließen, daß die Hefe einen Teil des in die Nährlösung gebrachten Kupfervitrioles in Kupferphosphate ($Cu_2H_2P_2O_8$ und $Cu_3P_2O_8$) umwandelt, während ein anderer Teil durch die Zelle festgehalten wird. Bringt man eine derart mit Kupfer angereicherte Hefe in eine farblose Nährlösung, so tritt, zufolge der Beobachtungen von H. Will (1), das in den Zellen aufgespeicherte Metall, bzw. eine nicht näher bestimmte Verbindung desselben, in die Flüssigkeit über, so daß diese sich merklich bläut. Man darf wohl vermuten, daß hier eine Verbindung des Kupfers mit Stoffen von der Art des auf S. 232 des I. Bandes gekennzeichneten Hefengummis im Spiele ist. Man wird also auch aus diesem Grunde die von den zuvor genannten Forschern ange-

gebenen Grenzzahlen über die Giftwirkung des Kupfersulfates nicht für unbedingt gültig halten dürfen.

Der Gärungstechniker, welcher die für seinen Betrieb benötigte Reinhefe in kupfernen Gefäßen (s. 5. Kap. d. V. Bds.) heranzüchtet, wird stets dafür sorgen müssen, daß der letzteren Innenseite an allen Stellen, 5 zu denen die gärende Flüssigkeit zutreten kann, gut verzinnt sei. Anderntfalls wird das Kupfer angegriffen und eine daran ziemlich reiche Satzhefe gewonnen, was zu vermeiden aus mehr als einem Grunde geboten ist. So hat H. Seyffert (1) in den Aschen (s. S. 88) von Reinhefen, welche in einem in dieser Hinsicht mangelhaften Apparate heran- 10 gewachsen waren, die Mengen von 0,27—0,64 Proz. CuO vorgefunden. Diese werden, auf Grund des zuvor Gesagten, vermutlich einerseits auf unlösliche Kupfersalze, welche während der Gärung entstanden und zu Boden gesunken sind, und andererseits auf kupferhaltige Inhaltsbestandteile der Hefenzellen selbst aufzuteilen sein. Das zur Verzinnung der 15 Apparate zur Verwendung kommende Zinn soll an Blei so arm als möglich sein; denn auch dieses Metall beeinträchtigt, wie Prior (1) beobachtet hat, die Hefe recht merklich.

§ 28. Verhalten der Hefenzellen zum Alkohol.

Der durch die Gärtätigkeit der Hefe entstehende Alkohol ist vom 20 Standpunkte der ökologischen Gärungstheorie (s. Bd. I, S. 330) aus gewiß als Kampfstoff zu betrachten, welcher in zuckerhaltigen Nährböden das Aufkommen mancher anderer pilzlicher Mitbewerber zu erschweren vermag. Er wird jedoch, wenn er durch die vorschreitende Gärung nach und nach sich anhäuft, auch seinem Erzeuger selbst zum Hemmnis 25 weiterer Entwicklung und Wirkung. Auch hier läßt sich, wie bei den Hefengiften überhaupt, vor allem die Bemerkung machen, daß zunächst die Vermehrung der Zellen zum Stillstand gebracht wird, daß es aber schon eines höheren Gehaltes bedarf, um auch die Gärtätigkeit aufzuheben, und daß jener schließlich noch weiter gesteigert werden muß, 30 wenn es sich um die Abtötung der Zellen handelt. Absolut gültige Zahlenangaben darüber darf man jedoch nicht erwarten, weil ja, wie anderwärts so auch hier, selbst bei ein und derselben Hefenart die Größe des zur Erzielung einer gewünschten Wirkung erforderlichen Alkoholgehaltes durch die übrigen, manchmal gar nicht genau festzu- 35 stellenden, äußeren Bedingungen (z. B. die Beschaffenheit des Nährbodens) mit bestimmt wird.

Der zur **Hemmung der Vermehrung** der Zellen erforderliche Gehalt an Alkohol ist in dem Falle ein verhältnismäßig geringerer, in welchem er allmählich in der Nährlösung zu der gefragten Höhe an- 40 wächst, so daß also die Zellen durch viele Generationen hindurch seiner schädigenden Einwirkung ausgesetzt sind. So wird, zufolge der Versuche von M. Hayduck (1), in den gärenden Spiritus-Maischen die Vermehrung der Hefenzellen eine träge, sobald 2 Vol.-Proz. Alkohol entstanden sind; sie hört ganz auf, wenn dieser Gehalt auf ungefähr 45 6 Vol.-Proz. gestiegen ist. Die Erreichung jenes ersten Grenzpunktes fällt ziemlich genau mit dem Beginn der wallenden Gärung des Bottichinhaltes zusammen, einer dem Praktiker sehr wohl bekannten Erscheinung, welche unter normalen Verhältnissen ungefähr 30 Stunden nach dem Anstellen der Maische, d. i. dem Versetzen mit der Hefe, auf- 50

tritt. Von jenem Augenblicke ab ist die Zellvermehrung, solange sie überhaupt noch sich abspielt, eine verhältnismäßig schwache, so daß also der Fabrikant von Preßhefe seine Hefe während jenes ersten Abschnittes, der von Delbrück als Vorgärung oder Angären be-
5 zeichnet worden ist, abschöpft. Ihm ist die Hefenernte die Hauptsache und deshalb die Schaffung günstigster Bedingungen für die Zellvermehrung der Gegenstand der obersten Sorge. Der dabei gewonnene Alkohol ist ihm sozusagen Nebenprodukt. In der Spiritusfabrik hingegen ist das Verhältnis umgekehrt; hier gilt es, die Zellvermehrung,
10 welche ja auch auf Kosten von Zucker der Maische vor sich geht und also die Spiritus-Ausbeute mindert, auf das zulässige Geringstmaß zu beschränken. Auch in der Brauerei von untergärigem Biere gibt sich die Beendigung der Vermehrung der eingesäten Hefenzellen durch ein auffälliges Zeichen kund, das ist das Auftreten der sog. niederen
15 Kräusen auf der Oberfläche der Würze. Der Praktiker bezeichnet diese Erscheinung als Ankommen und die (je nach der Höhe der Temperatur verschieden lange) Zeitdauer, welche vom Anstellen der Würze bis zum Ankommen verstreicht, als Bier-Hergehen oder Bier-Herführen. Der letztere Ausdruck darf nicht mit dem Zeug-Her-
20 führen (s. S. 117) verwechselt werden. Der Alkohol-Gehalt der gärenden Würze beträgt zur Zeit des Ankommens, also der Hemmung der Zellvermehrung, 2—2,2 Vol.-Proz., wie durch Mohr (1) zuerst festgestellt und durch Fr. Schönfeld (1) dann bestätigt worden ist.

Beträchtlich höher muß man den Alkohol-Gehalt des Nährbodens in
25 dem Falle machen, wenn es gilt, in einer von Alkohol bisher noch freien Flüssigkeit die darin enthaltenen lebenskräftigen Hefenzellen an der **Entwicklung zu hindern,** also z. B. wenn Traubenmost auf diese Art haltbar („stumm") gemacht werden soll. Dann reichen die zuvor angegebenen 6 Vol.-Proz. ganz und gar nicht aus, sondern müssen durch
30 mindestens noch 4 Vol.-Proz. verstärkt werden; denn 10 Vol.-Proz. sind, zufolge der Versuchsergebnisse von Hayduck (3) und E. Laurent (1), die Geringstmenge, welche man zusetzen muß, um die Vermehrung der Hefenzellen in einer alkoholfreien Nährlösung zu verhindern. Ja selbst diese Grenzzahl ist dann noch beträchtlich nach oben zu verschoben
35 worden. Es ist H. Müller-Thurgau (2), welcher nicht nur die schon von früheren Forschern bemerkte Tatsache, daß die einzelnen Hefenstämme verschieden stark empfindlich gegen Alkohol sind, eingehend untersucht, sondern auch solche Stämme aufgefunden hat, welche noch dann sich kräftig vermehren, wenn sie in einen Nährboden gebracht
40 werden, welcher 12—12,5 Vol.-Proz. Alkohol enthält. Diese Feststellung, welche hauptsächlich an deutschen und schweizerischen Weinhefen gemacht worden ist, hat später dann durch die Untersuchungen von Ces. Forti (1) an italienischen Weinhefen eine Erweiterung und Bestätigung erfahren. Bei der durch Inui (1) studierten Bereitung des
45 Reisbranntweines Awamori auf den Luchu-Inseln bei Formosa wirkt eine von jenem Forscher beschriebene und als *Sacch. Awamori* benannte Hefe mit, deren Entwicklung erst durch 13 Proz. Alkohol im Nährboden merklich verzögert und erst durch 20 Proz. vollständig verhindert wird. Die durch K. Yabe (1) untersuchte Hefe, welche bei der Bereitung des
50 Saké eine Rolle spielt (s. 9. Kap. d. V. Bds.), stellt ihr Wachstum erst bei einem Gehalte von 24 Proz. Alkohol im Nährboden ein. Viel empfindlicher sind zwei rote Sproßpilze, welche in der Luft von Japan und an der Oberfläche von Reisstroh durch Yabe (2) aufgefunden und mit den

ihnen nicht ganz mit Recht zukommenden Namen *Saccharomyces japonicus* und *S. Keiskeana* belegt worden sind; diese werden schon durch einen Gehalt von 7 Proz. Alkohol in der Nährlösung an der Entwicklung gehindert. Die durch Richard Meissner (1) beschriebenen Sproßpilze, welche nicht fähig sind, Alkohol zu bilden, und also nicht eigentlich zu den Hefen zählen, wohl aber darum technisch wichtig sind, weil sie Most und Wein zähe zu machen vermögen, stellen Vermehrung und Schleimbildung ein, wenn der Nährboden mehr als 5 Vol.-Proz. Alkohol enthält.

Um die **Gärtätigkeit zu verhindern** oder aufzuheben bedarf es, unter sonst gleichen Bedingungen, eines größeren Zusatzes von Alkohol als jener ist, welcher der Vermehrung der Hefenzellen schon Einhalt tun kann. So vermochte eine von Hayduck (2) untersuchte Preßhefe in einer mit 7 Vol.-Proz. Alkohol versetzten Saccharose-Nährsalz-Lösung nicht mehr sich zu vermehren, wohl aber noch lebhafte Gärung durchzuführen. Um das Eintreten auch dieser zu verhindern, ist, zufolge der Ergebnisse der von Brefeld (1) angestellten Versuche, ein Alkohol-Zusatz von 17,3 Vol.-Proz. zur Nährlösung erforderlich. In Hayduck's (3) Versuchen hingegen konnte schon in einer mit nur 15 Vol.-Proz. Alkohol versetzten Nährlösung das Ausbleiben der Gärung bemerkt werden. V. Peglion (1) fand in einem italienischen Weine während dessen Nachgärung eine Hefe am Werke, welche auch bei Anwesenheit von 14,3 Vol.-Proz. Alkohol im Nährboden noch Gärtätigkeit entfaltete. Weitere Angaben über die Beeinflussung der Alkoholgärung durch anwesenden Alkohol sind im 17. Kapitel zu finden. In betreff der Mycodermen sei auf das 14. Kapitel verwiesen.

Von den **äußeren Bedingungen,** welche einen bestimmenden Einfluß auf die Größe des die Gärung hemmenden Gehaltes bzw. Zusatzes von Alkohol zur Nährlösung nehmen, ist in erster Linie die **Temperatur** zu nennen. Innerhalb jener Grenzen, welche hier überhaupt in Betracht kommen können, steigt mit ihr auch die Empfindlichkeit. Denn mit ihr wächst erstens in physikalischer Hinsicht die Durchlässigkeit der Zellmembran für den auf dem Wege der Osmose dem Innern der Zelle zustrebenden Alkohol, und zweitens in physiologischer Hinsicht die Labilität der Molekülgruppen des Plasmas, also dessen Empfänglichkeit für äußere Einflüsse. Wir verdanken H. Müller-Thurgau (1) einige Feststellungen betreffend diese Beziehung. Er fand bei der von ihm gewählten Versuchszusammenstellung (d. h. Beschaffenheit der Nährlösung und Art des Hefenstammes), daß unter sonst gleichen Bedingungen die Gärung zum Stillstehen kam

bei 36° C, sobald entstanden waren 3,8 Gew.-Proz. Alkohol
„ 27° „ „ „ „ 7,5 „ „ „
„ 18° „ „ „ „ 8,8 „ „ „
„ 9° „ „ „ „ 9,5 „ „ „

Das Bestehen einer Beziehung zwischen Höhe der Temperatur und Größe der Empfindlichkeit der Hefe gegen Alkohol scheinen die alten praktischen Brauer gefühlt zu haben, als sie den wichtigen Grundsatz ihrer Gärführung — welche nicht bloß die Herstellung guten Bieres sondern auch die Gewinnung einer gärkräftigen Satzhefe anstrebt — aufstellten: Die Temperatur im Bottich zu Anfang der Gärung (wo also nur wenig Alkohol vorhanden ist) ansteigen lassen und dann langsam hinabdrücken.

Die **Beschaffenheit der Nährlösung** nimmt gleichfalls Einfluß auf die Größe der Empfindlichkeit der Hefe gegen Alkohol, also (in gärungs-

technischer Hinsicht) auf die Höhe des in der vergärenden Flüssigkeit zu erreichenden Alkoholgehaltes. Leider liegen über diese Beziehung nur wenige einwandfreie Versuche vor, so z. B. von Müller-Thurgau (1). Diese haben erkennen lassen, daß unter sonst gleichen Bedingungen die durch den Alkohol bewirkte Beeinträchtigung der Zelltätigkeit der Hefe mit steigendem Zuckergehalte der Nährlösung wächst. Auf diese (zwar nicht in ihrer Ursache erkannte wohl aber in ihrer Wirkung bemerkte) Tatsache ist die Begründung jenes Verfahrens zurückzuführen, welches unter dem Namen *Drauflassen* in verschiedenen Gärungsgewerben, insbesondere in den Melassenbrennereien, schon seit langem geübt wird und als vorteilhaft sich erwiesen hat. In jenen Ländern, in welchen die Branntweinsteuer entweder ganz oder zum Teil nach der Größe des Maischbottiches, bzw. Gärbottiches, bemessen wird, liegt es, von anderen Vorteilen nicht zu reden, schon aus diesem einen Grunde im Interesse des Brenners, seine Bottiche so dick (d. h. zuckerreich) als nur irgend tunlich zu bemaischen. Da kommt er aber nun in Zwiespalt mit der, wie gesagt, mit dem Zuckergehalte steigenden Empfindlichkeit der Hefe gegen Alkohol. Doch auch hier hat der findige Praktiker durch vieles Probieren einen Ausweg erspäht: er stellt eine solche Verdünnung der zu vergärenden Melasse her, daß darin erfahrungsgemäß die Gärung noch glatt verläuft, und setzt dann, in dem Maße als Zucker vergoren worden ist, dicke Melasse allmählich zu. In jenen anderen Brennereien, welche nicht Melasse sondern Rohfrucht (Kartoffeln, Mais u. dgl.) verarbeiten, ist aus Gründen, welche hier nicht zu erörtern sind, dieses Drauflassen nicht gut ausführbar. In den Brauereien hingegen greift man nicht selten dazu, und zwar insbesondere dann, wenn die verfügbare Menge von Stellhefe nicht ausreicht und also rasch vermehrt werden soll (s. 6. Kap. d. V. Bds.). In den für die Herstellung von *Ausleseweinen* bestimmten zuckerreichen Mosten, welche ohne die Anwendung des eben beschriebenen Kunstgriffes vergoren werden, bleibt, infolge der in Rede stehenden Wechselbeziehung, die Gärung stehen, bevor noch aller Zucker verarbeitet ist, und man erhält derart Weine, welche zwar ausgegoren (also fertig) aber dennoch süß sind.

Eine gewisse **Anpassungsfähigkeit** (s. Bd. I, S. 490) kommt den Hefen auch in betreff des Alkoholes zu, so zwar, daß sie allmählich daran gewöhnt werden können, auch mit einem Alkoholgehalt der Nährlösung sich abzufinden, der höher ist als jener, durch welchen vordem ihre Tätigkeit schon eingestellt wurde. Diese Fähigkeit bewegt sich jedoch innerhalb verhältnismäßig enger Grenzen, wie Em. Laurent (1) an einer Reihe von Bierhefen und Weinhefen festgestellt hat.

In einem Nährboden liegend, in welchem der Alkohol durch ihre eigene Tätigkeit nach und nach zu bedrohlicher Höhe anwächst, gehen die Hefenzellen, wie H. Müller-Thurgau (1) dargetan hat, in einen Ruhezustand über, d. h. sie verwandeln sich in **Dauerzellen** (s. S. 17 u. 42), welche auf dem Grunde der Flüssigkeit liegen bleiben. Diese sind nun zur Erregung von Gärung unvermögend, auch dann wenn sie in frische, alkoholfreie Nährlösung übertragen werden. Sie treiben aber in einer solchen nach einiger Zeit eine bis mehrere Tochterzellen hervor, welche nun die Vergärung des ihnen gebotenen Zuckers durchführen. — Auf der Verhinderung der Bildung dieser gärungsuntüchtigen Dauerzellen beruht wohl hauptsächlich die günstige Wirkung jenes Ratschlages, welcher den Weinbauern gelegentlich erteilt wird: nämlich die träg gewordene Gärung im Mostfasse dadurch anzuregen, daß man mit Hilfe

eines Holzstabes oder dgl. die Hefe aufrührt. Zu einem späteren Zeitpunkte der Gärung, wo die Klärung, d. i. das Absetzen der Hefe, schon beträchtlich weit vorgeschritten ist, erfolgt die Vergärung des noch vorhandenen Zuckers, also die Bildung von Alkohol, fast nur noch auf dem Grunde der Flüssigkeit dicht über der daselbst angesammelten Satzhefe. Dieser Alkohol aber verteilt sich kaum mehr; denn der ihm innewohnende Auftrieb ist in der stark geistigen Flüssigkeit nun verhältnismäßig gering und reicht nicht mehr aus, um den Reibungswiderstand in der Flüssigkeit zu überwinden und also das Emporsteigen des entstehenden Alkohols und dessen Verteilung zu ermöglichen. Infolge dessen sammelt sich knapp über der Bodensatzhefe eine Schichte von alkoholreicherer Flüssigkeit an, unter deren Einfluß die ihr zunächst ausgesetzten, obersten Zellen in den Ruhestand übergehen müssen und sich in Dauerzellen umwandeln. Diese liegen dann wie ein Wall zwischen der noch zuckerhaltigen Flüssigkeit und den noch gärtüchtigen unteren Schichten der Satzhefe, hindern das Zusammentreffen beider und bringen somit die Gärung zum Stillstehen. Hier nun Wandel zu schaffen und also aufzumischen, das ist der Zweck des empfohlenen Aufrührens. In Uebereinstimmung mit der zuvor berichteten Beobachtung MÜLLER-THURGAU's steht auch das Ergebnis einer von J. WORTMANN (1) angestellten Untersuchung über den Hefengehalt von Flaschenweinen. In 28 von 54 Proben verbürgten hohen Flaschenalters und genau bekannter Behandlungsweise hat er das Vorkommen von entwicklungsfähigen Sproßpilzen (Hefen und Torulen) nachweisen können.

Die Auffindung und Verwendung von Hefen von hohem Widerstand und geringer Empfindlichkeit gegen Alkohol ist insbesondere für die Weinbereitung und Obstweinerzeugung von großem Nutzen geworden, und zwar für dreierlei Zwecke, erstens für die künstlich erregten Nachgärungen, zweitens für die sog. Umgärungen und drittens für die Champagnererzeugung; das 16. Kapitel des V. Bandes wird über diese Fragen ausführliche Angaben bringen. Aehnliches Interesse hat auch die Bereitung des Saké, des japanischen Reisbieres, dessen Alkoholgehalt zufolge A. SCHROHE (1) meist in der Höhe von 14 Gew.-Proz. sich hält, ab und zu aber sogar 18 Proz. erreicht; im 9. Kapitel des V. Bandes wird darüber noch die Rede sein.

Das in den vorstehenden Zeilen Gesagte bezieht sich nur auf den Aethylalkohol. Ueber den Einfluß, welchen dessen homologe Verwandten auf die Gärtätigkeit von Hefe auszuüben vermögen, sind zuerst durch P. REGNARD (1) im Jahre 1889 an einer nicht näher bezeichneten Hefenart und dann im Jahre 1897 durch K. YABE (3) an der schon auf S. 130 angeführten Sakéhefe einige Versuche angestellt worden. Jener verwendete pro 10 g Hefenaussaat 250 ccm einer 8-proz. Traubenzucker-Auflösung, also einen nicht besonders günstigen Nährboden. Sie fanden so, daß die Gärung in den angelegten Zuchten nicht eintrat, wenn sie einen der nachstehend verzeichneten Zusätze (in Vol.-Proz.) erhalten hatten:

	Methyl-A.	Aethyl-A.	Propyl-A.	Butyl-A.	Isobutyl-A.	Amyl-A.	Hexyl-A.	Capryl-A.
REGNARD:	20	15	10	2,5	—	1,0	0,2	0,1
YABE:	—	—	—	—	3,0	1,0	—	0,5

Die Schädlichkeit, d. h. die Giftwirkung, dieser Alkohole steigt also mit der Anzahl der Kohlenstoff-Atome im Moleküle an.

§ 29. Anorganische Säuren und Salze.

Ueber den Einfluß der **Kohlensäure** auf die Hefenzellen liegen zwar schon einige Beobachtungen vor, jedoch ist deren weitere Vertiefung wegen der großen und bisher noch nicht genug gewürdigten Tragweite dieser Frage für die Gärungstechnik sehr erwünscht. Bei Wiederholung der zuerst durch C. Prandtl (1) im Jahre 1865 angestellten Versuche der Züchtung von Bierhefe in Würze einerseits in offenen (also der Luft zugänglichen) und anderseits in zugeschmolzenen Röhren hat G. Foth (1) im Jahre 1887 bemerkt, daß in den letzteren die Vermehrung der Aussaat geringer ausfiel; es fragt sich aber, in wieweit daran die Kohlensäure selbst und in wieweit etwa der Mangel an Sauerstoff die Schuld trug. Nachdem inzwischen durch L. Lindet (1) im Jahre 1889 über einige Versuche ohne entscheidendes Ergebnis berichtet worden war, hat dann H. Ortloff (1) im Jahre 1900 die gleiche Beobachtung der Beeinträchtigung der Zellvermehrung an Reinzuchten von *Sacch. cerevisiae I* Hansen, *Sacch. Pastorianus I, II, III, Sacch. ellipsoideus I* und *II*, Hefe *Saaz*, Hefe *Frohberg* und Hefe *Logos* gemacht, durch welche er einen Strom von (angeblich sauerstoffloser) Kohlensäure während der ganzen Dauer der Entwicklung hindurchführte. In betreff der Weinhefen hatte H. Müller-Thurgau (5 u. 6) schon im Jahre 1889 gezeigt, daß sie durch einen höheren Kohlensäuregehalt des mit ihnen frisch beimpften Weines in ihrer Vermehrung gehindert, ja sogar abgetötet werden; Näheres darüber im 16. Kapitel des V. Bandes. In den Versuchen Lopriore's (1) an Zellen einer Reinzucht einer Bierhefe im hängenden Tropfen zeigte es sich, daß innerhalb der ersten 4—6 Stunden der Durchleitung von sauerstoffloser Kohlensäure durch die entsprechend veränderte Böttcher'sche Kammer (s. S. 110) an einzelnen wenigen Zellen noch Sprossung zu bemerken war, die aber dann weiterhin ganz unterblieb. Daß die Empfindlichkeit der einzelnen Arten und Rassen verschieden groß ist, war schon durch Foth (2) bemerkt worden, welcher den *Sacch. Pastorianus I* für widerstandskräftiger als die *Carlsberg Unterhefe Nr. 1* erkannt hatte, und ist auch aus Ortloff's Befunden zu entnehmen. Ein höherer Gehalt an dem in Rede stehenden Gase beeinträchtigt auch die Gärtätigkeit, in ihrer Gesamtheit in der Zucht beurteilt. Sowohl Foth als auch Ortloff hat dies festgestellt. Wie aber schon E. Chr. Hansen (1) und J. Chr. Holm (1) angedeutet haben, läßt ein solcher Befund zweierlei, einander entgegengesetzte Auslegungen zu: die auf die Zell-Einheit der Ernte bezogene Ausbeute an Alkohol kann zwar in den mit Kohlensäure behandelten Zuchten sich rechnerisch als geringer ergeben und also eine Beeinträchtigung durch dieses Gas erschließen lassen, und dennoch kann das Gegenteil der Fall gewesen und also die Gärtätigkeit der einzelnen arbeitenden Zelle sogar gesteigert worden sein, nämlich dann, wenn eine Anzahl von Zellen der Ernte schon sehr früh zu wirken aufgehört haben. Ueber die Beeinflussung der Leistung der einzelnen Zelle wissen wir demnach nichts Zuverlässiges. In einem Nährboden tätig, welcher in einem ausreichend starken Gefäße (z. B. in einer Champagnerflasche) gasdicht eingeschlossen ist, wird die Hefe und ihre Gärtätigkeit bald unter dem Einflusse eines höheren Kohlensäure-Druckes stehen und Beeinträchtigung erleiden, und zwar nicht durch den hohen Gasdruck als solchen, gegen den ja auch die Hefen sehr wenig empfindlich sind (s. Bd. I, S. 458), wohl aber durch die verstärkte Konzentration an dieser

Säure in der Gärflüssigkeit. Die genauere Bestimmung des Höchstdruckes, bei welchem in geschlossenen Gefäßen die Gärung schließlich zum Stillstand kommt, wäre erwünscht: in den durch CH. G. MATTHEWS (1) angestellten Versuchen mit Burton-Hefe in Bierwürze war bei 12,6 at diese Grenze noch nicht erreicht. Umgekehrt hat eine künstliche Entlastung der gärenden Flüssigkeit durch Absaugen der Kohlensäure (und mit ihr auch einiger anderer schädlicher Spaltprodukte flüchtiger Natur) eine Beschleunigung der Gärung und Erhöhung des Vergärungsgrades (s. Bd. V, S. 146) zur Folge, was schon durch BOUSSINGAULT (1) bemerkt, später durch PRIOR (2) u. a. genauer verfolgt wurde und durch GRAUAUG und KRANZ (1) wie auch durch NATHAN in seinem Hansena-Apparat (s. Bd. V, S. 95 u. 142) und durch PFAUDLER in seinem sogen. Vacuum-Gärverfahren praktisch ausgenutzt wird, über welch letzteres L. AUBRY (2) berichtet.

Ueber die Beeinflussung der Hefen durch die schweflige Säure, sei es in gasförmigem Zustande oder in Gestalt ihrer sauren Salze, insbesondere des sogen. doppeltschwefligsauren Kalkes, ist schon im 21. Kapitel des I. Bandes das Wichtigste gesagt worden. Ergänzende Bemerkungen werden gelegentlich der Besprechung ihrer Verwendung in der Brauerei, Brennerei und Weinbereitung im 7., bzw. 11. und 16. Kapitel des V. Bandes gebracht werden.

Die arsenige Säure und ihre Kalium- und Natriumsalze, deren verhältnismäßig schwache Einwirkung auf die Hefen durch C. WEHMER (2) und durch CHR. KNOESEL (1) studiert wurde, sind zwar für die Praxis der Gärungstechnik ohne Bedeutsamkeit, haben aber beim theoretischen Studium des Enzymes der Alkoholgärung (s. d. 17. Kap.) Anwendung gefunden.

Die Salzsäure, die Schwefelsäure, die Flußsäure und einige andere Fluorverbindungen wirken auf die meisten Bakterien verhältnismäßig viel schärfer als auf die Hefen ein. Bei richtiger Wahl der Konzentration kann man also diese letzteren gegen das Aufkommen jener ersteren schützen. Das von der Säuerung des Hefengutes der Brennereien handelnde 11. Kapitel des V. Bandes wird darüber ausführliche Angaben bringen und unter einem auch das Verhalten der Hefen zu jenen drei Säuren besprechen. Daß die Hefen an und für sich einer sauren Reaktion des Nährbodens nicht unbedingt bedürfen, ist schon auf S. 375—376 des I. Bandes gesagt und auch durch CHR. KNOESEL (1) bemerkt worden. Jedoch wirkt freie Säure, innerhalb gewisser Grenzen, anreizend sowohl auf die Zellvermehrung als auch auf die Gärtätigkeit ein.

Die Borsäure, die im 21. Kapitel des I. Bandes als ein sehr schwaches Bakteriengift bezeichnet wurde, schadet auch den Hefen nur wenig: J. MATTERN (1) und E. BIERNACKI (1) haben dies schon bemerkt. In H. WILL's (1) Versuchen konnten durch sie, sogar bei einer Einwirkungsdauer von 20 Minuten, nicht alle Zellen abgetötet werden. Das Gleiche wurde vom borsauren Kalk, wie auch, und zwar in Berichtigung einer früheren Angabe WERNKE's (1), vom **Borax** festgestellt. Diese Harmlosigkeit ermöglicht die Ausnutzung einer anderen Eigenschaft des letztgenannten Salzes, welche zuerst J. DUMAS (1) gelegentlich seiner Studien über die Einwirkung gesättigter Lösungen verschiedener Salze auf Hefe beobachtet hat, nämlich die Fähigkeit, sozusagen aussalzend auf Hefe zu wirken, also diese letztere aus ihrem flüssigen Nährboden niederzuschlagen, auszuscheiden. Vermittler für das Eintreten dieser

Reaktion ist das den Hefenzellen anhaftende Hefengummi (s. Bd. I, S. 232), welches, ebenso wie andere pflanzliche Gummistoffe, auf Zusatz von Borax-Lösung sofort zu einer Gallerte verdickt, aus der Flüssigkeit ausfällt und dabei die Hefenzellen selbst mit sich reißt. Man kann so 5 durch Zusatz einer genügenden Menge von gesättigter Boraxlösung zu einer flüssigen Zucht von Hefe diese letztere geradezu vollständig ausfällen und von jener abtrennen; dies ist bei Ausführung von quantitativ-analytischen Versuchen über den Stoffwechsel und die Gärwirkung der Hefe oft von großem Nutzen. Farbige Bestandteile des Nährbodens 10 (z. B. in Würze das Hopfenharz u. a. m.) bleiben in Lösung, sodaß also der Hefenniederschlag, der sich alsbald zu einer sehr festen Schichte zusammensetzt, rein weiß erscheint. Von diesem Verhalten macht man, auf WILL's (1) Vorschlag hin, auch in der Praxis der Hefenzüchtung vorteilhaft Gebrauch. Man versetzt die aus dem Gärzylinder des Rein- 15 zuchtapparates (s. Bd. V, S. 86) abgezogene, dickbreiige Satzhefe, wenn sie in gepreßtem Zustande verschickt werden soll (s. Bd. V, S. 100), mit 5-proz. Boraxlösung. Dadurch wird nicht bloß das Zusammensetzen des Breies beschleunigt und das Pressen ganz beträchtlich erleichtert, sondern auch der Farbenton der Hefe stark gemildert und also deren Aussehen ver- 20 schönert, ohne daß durch dieses kleine Mittel die Tauglichkeit der Hefe eine merkliche Einbuße erfährt.

Das Sublimat, das zufolge WERNKE (1) und WEHMER (2) ein verhältnismäßig schwaches Hefengift ist, kommt wegen seiner anderweitig starken Giftigkeit nicht für die Gärungstechnik in Betracht. Für diese 25 ebenfalls ohne praktische Bedeutsamkeit sind Wismutnitrat, Zinksulfat, Zinkchlorid, Ferrosulfat, Ferrochlorür, Manganchlorür, Kaliumhypermanganat, Aluminiumsulfat, Aluminiumchlorid und Kalialaun, deren Einwirkung auf Hefen durch H. WILL (1) studiert worden ist.

Wie schon durch J. DUMAS (1) gezeigt und dann durch U. GAYON 30 und E. DUBOURG (1) genauer geprüft worden ist, tritt aus den Hefenzellen eine beträchtliche Menge von stickstoffreichem Zellsaft aus, wenn man auf sie eine gesättigte Lösung eines dazu fähigen Salzes einwirken läßt, so z. B. das Acetat, Phosphat oder Sulfat des Natriums, das Acetat, Oxalat, Tartrat oder Jodid des Kaliums, das Magnesiumsulfat, das Calcium- 35 chlorid u. e. m. Noch ergiebiger ist, wie A. BÉCHAMP (1 u. 2) bemerkt hat, ein Verkneten der Hefe in gepreßtem Zustande mit dem gepulverten trockenen Salze selbst: es tritt meistens fast augenblicklich **Verflüssigung** des teigigen Gemenges ein. Auch Rohrzucker ist zu dem Zwecke tauglich, wenn man von ihm zwei Teile auf drei Teile Hefe verwendet, des- 40 gleichen auch arabisches Gummi u. a. m. Ueber die unter solchen Verhältnissen in manchen Fällen auftretende Selbstgärung der verflüssigten Masse hat C. J. LINTNER (1) eine Reihe von Beobachtungen angestellt, auf welche im 19. Kapitel noch zurückzukommen sein wird. In betreff der industriellen Ausnützung der Verflüssigung der Hefe sei auf S. 126 45 des V. Bandes verwiesen.

§ 30. Reizstoffe und Giftstoffe organischer Natur.

Die Wechselbeziehungen zwischen **organischen Säuren** aus der aliphatischen Reihe und den Hefen sind sehr mannigfaltig. Einige, so z. B. die Bernsteinsäure, treten als Produkt des Stoffumsatzes auf; da- 50 rüber wird im 18. und im 20. Kapitel noch zu reden sein. In anderen

Fällen wieder spielen derartige Säuren die Rolle einer Kohlenstoffquelle, dienen also dem Stoffwechsel als Material; darüber sind schon auf S. 94 einige Angaben gemacht worden. Und in noch anderen Fällen, die nun hier in Betracht kommen sollen, erregen sie dadurch Interesse, daß sie als Reizstoffe oder als Giftstoffe wirken. Verhältnismäßig sehr stark 5 empfindlich sind die Hefen gegen die Buttersäure und müssen also im praktischen Betriebe der Brennereien, in denen von ihr Gefahr droht, geschützt werden; das 11. Kapitel des V. Bandes wird darüber genauere Angaben bringen und unter einem auch das Verhalten der Hefen zur Milchsäure besprechen. Die allgemein gültige Tatsache, daß durch 10 einen Reiz von bestimmter Art und Größe die einzelnen Hefenarten verschieden stark beeinflußt werden, hat in betreff der Weinsäure eine praktisch wichtige Ausnutzung erfahren. Gelegentlich der kritischen Prüfung von PASTEUR's Verfahren zur Reinigung der Brauereibetriebshefe (s. Bd. V, S. 75) hat E. CHR. HANSEN (2) in betreff der in der 15 Brauerei verwendeten Kulturhefen (*Sacch. cerevisiae I* HANSEN, *Carlsberg Unterhefe Nr. 2* u. a.) festgestellt, daß sie gegen Weinsäure empfindlicher sind als die Krankheitshefen (*Sacch. Pastorianus I* u. *III*, *Sacch. ellipsoideus II*), und zwar in dem Sinne, daß in einem Gemische dieser mit jenen sich das Mengenverhältnis zugunsten der wilden Hefen verändert, 20 wenn man die Züchtung in einer mit 4 Proz. Weinsäure versetzten 10-proz. Saccharoselösung vornimmt. Die bei wiederholter Ueberimpfung in solcher Flüssigkeit immer weiter vorschreitende Zurückdrängung der Kulturhefen und also prozentische Anreicherung an wilden Hefen gibt ein vortreffliches Hilfsmittel zur Nachweisung dieser letzteren in kri- 25 tischen Fällen, insbesondere zur Prüfung der Hefe eines kontinuierlich in Betrieb stehenden Reinzuchtapparates, an die Hand; es wird darum von dieser sogen. Weinsäuremethode noch auf S. 169 des V. Bandes die Rede sein. Die von K. YABE (3) untersuchte Saké-Hefe entwickelt sich in jener Lösung überhaupt nicht. Der Einfluß der Essigsäure 30 ist an Reinzuchten zuerst durch LAFAR (1) studiert worden; die daraufhin geprüften fünfzehn Rassen von Weinhefen ließen starke Unterschiede in der Größe der Empfindlichkeit erkennen. RODERICH MEISSNER (1) hat hierauf später das Gleiche an den Hefen *Saaz*, *Frohberg* und *Logos* bemerkt, die jedoch von dieser Säure weit weniger vertragen können 35 als jene Weinhefen; denn die ersten zwei büßen ihr Gärvermögen fast vollständig bei 0,25 Proz. Säuregehalt und die dritte bei 0,375 Proz. ein, während hingegen jene fünfzehn ausnahmslos bei 0,78 Proz. Säuregehalt und drei von ihnen sogar noch bei 1,0 Proz. ihre Gärtätigkeit zur Geltung brachten. Daß der entwicklungshemmende Einfluß dieser Säure 40 dadurch gemildert werden kann, daß man den Nährboden (Most) durchlüftet, hat H. MÜLLER-THURGAU (4) festgestellt. Die Ameisensäure verlangsamt zufolge DUCLAUX (1) die Entwicklung der in Würze ausgesäten Zellen verschiedener Bierhefen, wenn sie in der Menge von 0,4 g im Liter vorhanden ist; bei doppelt so großem Zusatz unterbleibt die Ver- 45 mehrung. Die Oxalsäure, die zufolge O. LOEW (1) schon in einprozentiger Lösung die Gärtüchtigkeit der Hefe binnen 24 Stunden vernichtet, tötet zufolge H. WILL (1) in 10-proz. Lösung bei einer Einwirkung durch 5 Minuten ab. Die Bernsteinsäure beeinträchtigt zufolge M. HAYDUCK (4) selbst in der Gabe von 0,59 Proz. die Gärtätig- 50 keit der Hefe nicht und kann durch diese sogar verzehrt werden, wie E. KAYSER (2) gezeigt hat. Daß auch gegen Aepfelsäure und Citronensäure die einzelnen Hefen verschieden stark empfindlich

sind, hat E. Kayser (1) bemerkt. Ein Zusatz von 0,2—0,4 Proz. von der letztgenannten Säure schob in den durch J. Behrens (1) mit *Carlsberg Unterhefe Nr. 1* angestellten vergleichenden Versuchen in ungehopfter Bierwürze die Erreichung der höchsten Entfaltung der Gärtätigkeit
5 zeitlich etwas hinaus, ohne aber die Gesamtleistung zu schmälern.

Das Verhalten der Hefen zu den **Hopfenharzen,** über welch letztere man die wichtigste chemische Literatur bei G. Barth (1) zusammengestellt findet, ist noch nicht ausreichend genug studiert. M. Hayduck (5—8) hatte deren dreierlei aus dem Hopfen abgeschieden: zwei bittere,
10 antiseptisch wirkende Weichharze (α- und β-Harz) und ein geschmackloses Hartharz. Jenen ersteren zweien ist zum größten Teile die leichte Sterilisierbarkeit der gehopften Bierwürze zuzuschreiben, die schon durch ein viertel- bis halbstündiges Kochen steril wird. Das ätherische Oel des Hopfens, welches diesem letzteren das charakteristische Aroma
15 verleiht, wie auch der Gerbstoff sind ohne merkliche antiseptische Wirkung, wie Hayduck gezeigt hat. Demselben Forscher zufolge bewirken die zwei Weichharze eine merkliche Verlangsamung des Gärverlaufes. Daß aber dennoch der schließliche Endvergärungsgrad (s. Bd. V, S. 150) in gehopfter Würze ein größerer als in ungehopfter
20 wird, hat L. Aubry (1) festgestellt und J. Behrens (1) bestätigt. F. W. Richardson (1) hingegen will das Gegenteil bemerkt haben. Die durch Hayduck gemachte Beobachtung, daß mit der Steigerung der Hopfengabe in der Würze die Größe der aus dieser dann durch die Hefe entnommenen Mengen von Stickstoffverbindungen anwächst, ist weiterer
25 Verfolgung würdig, wobei eine zugehörige Bemerkung bei Behrens (1) zu berücksichtigen wäre. In betreff des Anteiles der Hopfenharze an der Kräusenbildung der gärenden Bierwürze sei auf S. 143 des V. Bandes verwiesen.

Gegen die Gerbstoffe des Weinmostes und einiger Obstmoste
30 sind manche Hefen etwas empfindlich, wie A. Rosenstiehl (1) bemerkt hat. Die Praxis der Weinbereitung kennt diese Tatsache gut und trägt ihr auch durch besondere Maßnahmen Rechnung, von denen im 16. Kapitel des V. Bandes die Rede sein wird.

Unbekannt ist noch die Natur jener Harze und ätherischen Oele,
35 welche an der Schwergärigkeit des Saftes der Wachholderbeeren die Schuld tragen; G. Kassner (1) hat darüber eine Bemerkung gemacht.

Das Senföl ($C_3H_5 \cdot NCS$) wirkt zufolge Wernke (1) in der Gabe von 1:16700 abtötend auf die Hefen ein.

Das **Maltol** ($C_6H_6O_3$), durch Jos. Brand (1) zuerst in Caramel-Farb-
40 malz entdeckt und von Kiliani und Bazlen (1) für eine Methylpyromeconsäure gehalten, ist zufolge H. Will (2) nur ein schwaches Hefengift, das in einer Gabe von 0,1 Proz. wohl die Zellvermehrung zu verzögern vermag, praktisch aber nicht von Bedeutsamkeit ist, weil seine Menge in den Würzen weit unter jenem Prozentsatz bleibt. Auch das
45 beim Darren des Malzes (s. Bd. IV, S. 95) entstehende und aus diesem dann in die Würze übergehende, in den Bieren jedoch nur in Ausnahmsfällen noch aufzufindende **Furfurol** ($C_5H_4O_2$) wirkt zufolge H. Will (3) auf Hefen nur wenig, jedoch auf die einzelnen Rassen deutlich verschieden stark ein und tötete in der Gabe von 0,5 Proz. alle ab. Noch
50 nicht festgestellt ist, ob und in wieweit diese oder andere Röstprodukte des Malzes mit verantwortlich für die bekannte Erscheinung sind, daß die dunklen Würzen einen weniger hohen Vergärungsgrad als die aus blassem Malze bereiteten erreichen (s. Bd. V, S. 148). M. Irmisch (1)

hat über eigene Versuche und auch über solche von F. NIEMEYER betreffend diese Frage berichtet.

Von **Verbindungen aus der aromatischen Reihe** sind hier, soweit von ihnen nicht schon im 21. Kapitel des I. Bandes die Rede gewesen ist, zunächst Benzol, C_6H_6, Toluol, $C_6H_5 \cdot CH_3$, und Xylol, $C_6H_4(CH_3)_2$, 5 zu nennen, die zufolge WERNKE (1) angeblich in der Verdünnung von 1 : 200, bzw. 1 : 300 und 1 : 800 die Hefe abtöten. Die schon durch LEMAIRE, dann durch W. BUCHOLZ (1), H. HOFFMANN (1) und H. FLECK (1) studierte Wirkung der Karbolsäure, also des Phenoles ($C_6H_5 \cdot OH$), auf die Hefen ist durch CHR. KNOESEL (1) genauer geprüft worden; 10 diesem zufolge führt bei Zimmertemperatur ein Zusatz von ca. 0,5 Proz. Phenol den Tod der Zellen herbei. Durch das Eintreten einer zweiten und dritten Hydroxyl-Gruppe in das Phenol wird zufolge BIERNACKI (1) die Giftigkeit gemildert, so zwar daß das Resorcin, $C_6H_4 \cdot (OH)_2$, nur halb so stark und das Pyrogallol, $C_6H_3(OH)_3$, bloß ein Drittel so 15 stark wie jenes erstere wirkt. K. YABE (4) hat diese Beobachtung bestätigen und sie auch noch am Brenzkatechin, am Hydrochinon und am Phloroglucin machen können. Ziemlich kräftig wirkt die Benzoesäure, selbst in den geringen Mengen, in denen sie in wässerigen Flüssigkeiten sich auflöst, auf die Hefen ein. H. WILL (1) und später 20 C. WEHMER (2) haben dies festgestellt und damit H. FLECK (1) berichtigt. Die Praxis des Einmachens der Früchte (s. Bd. V, S. 73) zieht aus diesem Verhalten manchmal Nutzen. Eine durch WEHMER (1) an der Hefe *Frohberg* in verdünnter ungehopfter Bierwürze angestellte vergleichende Prüfung der Benzoesäure und ihrer drei Monoxy-Derivate hat gezeigt, 25 daß sowohl jene erstere wie auch ihr Orthoderivat, also die Salicylsäure, in der Menge von 0,1 Proz. keine Hefenentwicklung aufkommen ließen, und daß hingegen die m- und die p-Oxybenzoesäure in dieser Konzentration ohne merklichen Einfluß waren. G. HEINZELMANN (1) zufolge wirkt 0,1 g Salicylsäure pro Liter nicht störend sondern fördernd 30 (s. Bd. I, S. 344), hingegen 0,37 g schon abtötend; ähnlich war der Befund in den durch H. WILL (1) angestellten Proben. Ueber das Verhalten der Hefe zur Zimmtsäure hat FLECK (1) einige Angaben gemacht. Das schon durch BURKARD und SEIFERT (1) als sehr schwaches Hefengift erkannte Saccharin hindert zufolge MACHELEIDT (1) in der 35 Gabe von einem Prozent das Auftreten von Gärung in gehopfter Würze. Das Phenolphtalein ist in dieser Hinsicht in der Gabe von 0,7 Proz. zufolge G. BRYILANTS (1) ohne merklichen Einfluß. Das Verhalten der Hefen gegen einige Alkaloide ist durch CL. FERMI und E. POMPONI (1) geprüft worden. Ueber die Verwendung einiger neuerer Desinfektions- 40 mittel und Hefengifte im besonderen in der Brauerei wird auf S. 178 u. f. des V. Bandes noch die Rede sein.

Literatur

zum Kapitel Wirkung einiger technisch wichtiger chemischer Einflüsse auf die Hefen.

*__Amand,__ Abel, (1) La Cellule, 1902, Bd. 20, S. 225. *__Aubry,__ Louis, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1894, Bd. 17, S. 1. — (2) Ebenda, 1897, Bd. 20, S. 631. *__Barth,__ Georg, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1900, Bd. 23, S. 509. *__Béchamp,__ A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1872, Bd. 74, S. 184. — (2) Ebenda, 1879, Bd. 88, S. 866. *__Behrens,__ Johann, (1) W. f. Brauerei, 1896, Bd. 13, S. 802. *__Berlese und Sostegni,__ (1) La Revue intern. de viticulture et oenologie; ref. in Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1895, Bd. 1, S. 770. *__Biernacki,__ E., (1) Pflügers Archiv, 1891, Bd. 39, S. 112. *__Boussingault,__ (1) Comptes rend. de l'Ac., 1880, Bd. 91, S. 373. *__Brand,__ Josef, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1893, Bd. 16, S. 303; 1894, Bd. 17, S. 131. *__Brefeld,__ Oscar, (1) Landw. Jahr-

bücher, 1876, Bd. 5, S. 281. ***Bryilants,** G., (1) Milchztg., 1895, Bd. 24, S. 697. ***Bucholz,** W., (1) Pharmac. Zeitschr. f. Rußland, 1867, S. 627 u. 686; ref. in H. Hoffmann (1). ***Burkard** und **Seifert,** (1) Pharmac. Centralhalle, 1895, Bd. 36, S. 365. ***Duclaux,** Emil, (1) Ann. Pasteur, 1892, Bd. 6, S. 593. ***Dumas,** J. B., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1872, Bd. 75, S. 277. ***Fermi,** Claudio, und **Pomponi,** E., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1896, Bd. 2, S. 574. ***Fleck,** H., (1) Cit. n. Will (1). ***Foth,** Georg, (1) W. f. Brauerei, 1887, Bd. 4, S. 73 u. 305. — (2) Ebenda, 1889, Bd. 6, S. 263. ***Forti,** Cesare, (1) Bolletino di Notizie agrarie. 1896, Bd. 18, S. 363. ***Gayon,** Ulysse, und **Dubourg,** E., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1886, Bd. 102, S. 978. ***Grauaug,** A., und **Kranz,** J., (1) Engl. Patent 14150 v. 8. 7. 1899: cit. n. Kochs Jahresb., 1899, Bd. 10, S. 138. ***Hansen,** Emil Christian, (1) W. f. Brauerei, 1887, Bd. 4, S. 378. — (2) Comptes rendus de Carlsberg, 1891, Bd. 3, S. 24. ***Hayduck,** Moritz, (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1880, Bd. 3, S. 174. — (2) Ebenda, 1881, Bd. 4, S. 173. — (3) Ebenda, 1882, Bd. 5, S. 183. — (4) Ebenda, 1881, Bd. 4, S. 341. — (5) W. f. Brauerei, 1885, Bd 2, S. 267. (6) Ebenda, 1887, Bd. 4, S. 397. — (7) Ebenda, 1888, Bd. 5, S. 937. — (8) Ebenda, 1892, Bd. 9, S. 617. ***Heinzelmann,** G., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1882, Bd. 5, S. 458. ***Hoffmann,** Herrmann, (1) Mykologische Berichte, Bd 1, Gießen 1870, S. 30. ***Hoffmann,** Max, (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 369. ***Holm,** Just. Christian, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1889, Bd. 12, S. 301. ***Inui,** T., (1) Journ. College of Science, Univ. Tokyo, 1901, Bd. 15, S. 465. ***Irmisch,** Martin, (1) W. f. Brauerei, 1889, Bd. 6, S. 201 u. 413. ***Kassner,** G., (1) Apothekerzeitg., 1896, Bd. 11, S. 584. ***Kayser,** Edmund, (1) Ann. Pasteur, 1896, Bd. 10, S. 51. — (2) Ebenda, 1900. Bd. 14, S. 605. ***Kiliani,** H., und **Bazlen,** M., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1894, Bd. 27, S. 3115. ***Knoesel,** Christian, (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 241. ***Krüger,** Friedrich, (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1895, Bd. 1, S. 10. ***Lafar,** Franz, (1) Landw. Jahrbücher, 1895, Bd. 24, S. 445. ***Laurent,** Emil, (1) Annales Soc. belge de microscopie, 1890, Bd. 14, S. 29. ***Lindet,** L., (1) Bulletin Soc. chimique, 1889, 3. sér., Bd. 2, S. 195. ***Lintner,** C. J., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1899, Bd. 5, S. 793. ***Loew,** Oscar, (1) Münchn. medic. Wochenschr., 1892, Bd. 39, S. 370. ***Lopriore,** G., (1) Jahrb. wiss. Bot., 1895, Bd. 28, S. 531. ***Macheleidt,** (1) W. f. Brauerei, 1898, Bd. 15, S. 365. ***Mann,** Harold, (1) Ann. Pasteur, 1894, Bd. 8, S. 785. ***Mattern,** Julius, (1) Ber. ü. d. 7. Vers. d. freien Vereinigung bayr. Vertreter d. angew. Chemie in Speyer. Berlin 1889; ref. in Z. f. d. ges. Brauwesen, 1889, Bd. 12, S. 188. ***Matthews,** Ch. G., (1) The Brewer's Guardian, 1887; ref. in W. f. Brauerei, 1887, Bd. 4, S. 380. ***Meissner,** Richard, (1) Landw. Jahrbücher, 1898, Bd. 27, S. 715. ***Meissner,** Roderich, (1) Studien ü. d. Einfluß d. Essigsäure u. Milchsäure auf d. Hefen Saaz, Frohberg u. Logos in Saccharoselösung. Erlangener Dissert., Berlin 1897. ***Mohr,** P., (1) W. f. Brauerei, 1886, Bd. 3, S. 200 ***Müller-Thurgau,** Herrmann, (1) Ber. ü. d. General-Vers. d. D. Weinbau-Vereines 1884, S. 50. — (2) Dritter Jahresber. d. Versuchsstation etc. f. Obst-, Wein- u. Gartenbau in Wädensweil pro 1892—93, S. 73. — (3) Siebenter Jahresber. etc. pro 1898, S. 56. — (4) Bericht ü. d. Verhandl. d. VIII. D. Weinbau-Kongresses in Colmar 1885, Mainz 1886, S. 126. — (5) Bericht etc. d. XI. D. Weinbau-Kongresses in Trier 1889, Mainz 1889, S. 80. — (6) Bericht etc. d. XII. D. Weinbau-Kongresses in Worms 1890, Mainz 1891, S. 128. ***Ortloff,** Hugo, (1) Centralbl. f. Bakt, 2. Abt., 1900, Bd. 6, S. 676. ***Peglion,** V., (1) Staz. sperim. agrarie ital., 1895, Bd. 28, S. 369. ***Pichi,** P., (1) Cit. n. Centralbl. f. Bakt., 1892, Bd. 12, S. 662. ***Pottevin,** H., (1) Ann. Pasteur, 1894, Bd. 8, S. 796. ***Prandtl,** Carl, (1) Dinglers Journ., 1865, Bd. 178, S. 149. ***Prior,** Eugen, (1) Bayr. Brauer-Journ., 1893, Bd. 3, S. 2. — (2) Chemie und Physiologie d. Malzes u. d. Bieres. Leipzig 1896. ***Regnard,** P., (1) Comptes rendus de la Soc. de Biologie, 1889, 9. sér., Bd. 10, S. 124. ***Richardson,** F. W., (1) J. federated Inst. Brewing, 1898, Bd. 4, S. 128. ***Rommier,** A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1890, Bd. 110, S. 536. ***Rosenstiehl,** A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1900, Bd. 130, S. 195; 1902, Bd. 134, S. 119. ***Schönfeld,** Franz, (1) W. f. Brauerei, 1896, Bd. 13, S. 421. ***Schrohe,** A., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1891, Bd. 14, S. 96. ***Seyffert,** H., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1896, Bd. 19, S. 318. ***Tschirch,** Alexander, (1) Das Kupfer v. Standpunkt d. gerichtl. Chemie etc., Stuttgart 1893. ***Wehmer,** Carl, (1) Chem.-Ztg., 1897, Bd. 21, S. 73. — (2) Ebenda, 1899, Bd. 23, S. 163. ***Wernke,** (1) Dissert. Dorpat 1879; cit. n. Will (1). ***Will,** Herrmann, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1893, Bd. 16, S. 151 u. 411; 1894, Bd. 17, S. 43. — (2) Ebenda, 1898, Bd 21, S. 307. — (3) Ebenda, 1902, Bd. 25, S. 33. ***Wortmann,** Julius, (1) Landw. Jahrbücher, 1898, Bd. 27, S. 631. ***Yabe,** K., (1) Bulletin College Agriculture, Tokio, 1896, Bd. 2, S. 219. — (2) Ebenda, 1897, Bd. 3, S. 233. — (3) Ebenda, S. 221. — (4) Cit. n. Chem. Centralbl., 1894, II, S. 1048.

Dritter Abschnitt.

Abstammung und Kreislauf der Saccharomyceten. Deren Variabilität. Systematik der Familien der Saccharomyceten und Schizosaccharomyceten.

Von ALBERT KLÖCKER,
Kopenhagen.

(*Manuskript-Einlauf: 5. August 1905.*)

7. Kapitel.

Abstammung und Kreislauf.

§ 31. Die Frage nach der Abstammung.

Die Entdeckung der Hefe als eines Lebewesens fällt gerade in jene Zeit, in welcher der Streit über die Urzeugung sehr heftig wogte. Einer der beliebtesten Gegenstände, an denen das Entstehen von Organisiertem aus Nichtorganisiertem zu erweisen versucht wurde, waren eben die 5 Hefenzellen. Als dann die Lehre von der Urzeugung, dank den Bemühungen von PASTEUR u. a., aus dem Gebiete exakter Naturforschung endgültig hinausgedrängt war, mochte wohl gar mancher von ihren Anhängern den unbedingten und rückhaltlosen Verzicht darauf als eine zu große Forderung empfinden. Um doch etwas von der hergebrachten 10 Vorstellung zu retten, behauptete man nun, wenn auch nicht mehr die Gewißheit der elternlosen Entstehung der Hefenzellen aus lebloser Materie, so doch die Heranbildung aus anderen Pilzen. Einige Forscher wollten die Stammformen bei den niederen, andere bei den höheren Pilzen finden.

Zwei Umstände waren es, welche das Aufkommen solcher Meinungen 15 begünstigten und deren Lebensdauer verlängerten. Der eine lag in dem Mangel an wirklich zuverlässigen Reinzüchtungsverfahren, die es ermöglichen, daß man von einem einzigen Individuum, also hier einer einzigen Zelle, den Ausgang nehme und dessen Entwicklungsgang unter unablässiger Beaufsichtigung und Fernhaltung jeglicher anderer Keime 20

verfolge. Es hieße, von der Besonnenheit der betreffenden Forscher und Verfechter der Behauptung von der Abstammung der Hefen von anderen Pilzen eine zu geringe Meinung hegen, wenn man zu deren Rechtfertigung annehmen wollte, daß ihnen die Unerläßlichkeit solcher Anforderung nicht bewußt gewesen wäre, und sei es auch nur in einer weniger scharfen und deutlichen Auffassung. Sie mußten doch eingesehen haben, daß ihre Arbeitsweise unzuverlässig und das damit zu erzielende Ergebnis trügerisch ist, und mußten sich gesagt haben, daß sie als nächstliegende Aufgabe die Lösung dieser Vorfrage in Angriff zu nehmen hätten. Daß sie aus dieser unvermeidlichen Erkenntnis nicht die Folgerung gezogen und nicht alle ihre Bemühungen vorerst der Schaffung eines wirklich zuverlässigen Arbeitsverfahrens zugewendet haben, dies ist es, was man diesen Experimentatoren zum Vorwurf machen muß. Denn die verblüffenden Ergebnisse, welche sie mit Hilfe ihrer allzeit dienstbeflissenen Züchtungsverfahren hervorzauberten, brachten der echten Wissenschaft doppelten Schaden: sie erschwerten der wahrhaften Forschung die Arbeit und warfen überdies auf deren schließliche Ergebnisse schon im voraus den Schatten einer Geringschätzung, welche nur jenen mykologischen Schwarzkünstlerstückchen allein zukommt.

Der zweite der beiden Umstände nun, durch welche die Bestrebungen derjenigen begünstigt wurden, welche die Abstammung der Hefen von anderen Pilzen darzutun sich bemühten, war die von Tulasne gemachte Entdeckung der Pleomorphie. Dieser Forscher hatte seit dem Jahre 1851 an einer Reihe von Beispielen festgestellt, daß gewisse höhere Pilze unter verschiedenen Bedingungen der Ernährung in verschiedenen Lebensgestalten auftreten, z. B. das eine Mal als ein Fadenmycel mit daran sich einstellender Konidienbildung, das andere Mal als ein Sklerotium, aus welchem dann Hutpilzchen hervortreiben etc. Oder mit anderen Worten, es war damit erwiesen worden, daß manche von den Lebensgestalten, die man bis dahin als selbständige Pilzarten betrachtet und benannt hatte, mit einer zweiten zusammen den Entwicklungskreis einer und derselben Pilzart ausmacht, also nur je ein einzelnes Glied von jenem ist. Diese Lehre von der Vielgestaltigkeit (Pleomorphismus), deren Darlegung der wißbegierige Leser in den mykologischen Handbüchern, wie auch in einer Abhandlung von A. Gilkinet (1) finden kann, war durch ihren Schöpfer an sorgfältig untersuchten Fällen einwurffrei begründet worden und hat geradezu Epoche gemacht, und zwar nicht bloß in der Mykologie allein. In die Hefenkunde hingegen hat sie zunächst viel Unheil gebracht.

Der naheliegenden Einwendung, daß der zuvor bemerkte Mangel an zuverlässigen Reinzüchtungsverfahren auch die Gewißheit von Tulasne's Untersuchungsergebnissen in Frage zu stellen vermöge, sei sofort durch den Hinweis darauf begegnet, daß dieser Meister mit verhältnismäßig größeren Pilzen gearbeitet hat. Und wer sich dem Studium von dessen Werken hingibt, wird bald inne werden, daß solche Anzweiflung darin im großen und ganzen nichts zu erschüttern vermag. Zudem sind ja seine (hauptsächlich auf mikroskopische Untersuchungen sich stützenden) entwicklungsgeschichtlichen Feststellungen später dann durch die von A. de Bary u. a. ausgeführten Züchtungen bestätigt worden. Anders wurde es, als eine Schar von strebsamen Nacheiferern alsbald sich daran machte, das Bestehen solcher Pleomorphie auch bei den (der Untersuchung schwieriger zugänglichen) niederen und niedersten Pilzen zu erweisen. Während dort ganz gut ein einzelnes Individuum, sagen wir z. B. ein

Sklerotium von *Claviceps purpurea* (s. Bd. I. S. 178), ausgelesen und auf seine Entwicklung geprüft werden konnte, mußte man bei den mikroskopisch kleinen Pilzen, mangels Reinzüchtungsverfahren, von einer Vielzahl von Individuen, sagen wir z. B. einer Hefenprobe, den Ausgang nehmen. Ein geringer Gehalt an Keimen von anderen kleinen Pilzen, z. B. etlichen Konidien eines Schimmelpilzes, ließ sich nicht so leicht erkennen und feststellen, mußte aber dann sich geltend machen und sogar in den Vordergrund treten, wenn zugunsten dieser letzteren die äußeren Bedingungen sich änderten.

Es wurden im Laufe der Zeit viele Mitteilungen über die vermeintliche genetische Verbindung dieser Pilze mit anderen Pilzen veröffentlicht, Mitteilungen, welche indessen alle unrichtig waren. Wir werden im folgenden eine kurze Uebersicht über die geschichtliche Entwicklung der Frage und über die zu den verschiedenen Zeiten darüber gehegten Meinungen geben.

Im Gegensatze zu SCHWANN und CAGNIARD-LATOUR ist KÜTZING (1) im Jahre 1837 der Meinung, daß die Hefe durch Selbsterzeugung entstehe, sich vermehre und in Schimmelpilze *Sporotrichum* und *Mucor*) umbilde. Dasselbe meint WAGNER (1) im Jahre 1848 entdeckt zu haben. KARSTEN (1) glaubt, daß die in dem Fruchtsafte anwesenden kleinen Bläschen zu Hefenzellen umgebildet werden, ja, daß sogar der Zellkern in den Zellen der Früchte sich zu Hefe entwickeln könne. BAIL (1) hat im Jahre 1857 die Auffassung, daß die Hefe in einer Entwicklungsreihe zusammen mit *Mucor*, *Penicillium* und *Botrytis* gehöre. HOFFMANN (1) ist im wesentlichen mit BAIL einig. Obwohl A. DE BARY (1) im Jahre 1866 wider alle diese Mitteilungen vorgeht und ihre Unhaltbarkeit dartut, werden sie nichtsdestoweniger fortgesetzt. BAIL (2) tritt wieder auf und ebenso KARSTEN (2) im Jahre 1869; letzterer aber ist jedoch der Meinung, daß die Hefe weder in genetischer Verbindung mit Schimmelpilzen noch mit höheren Pilzformen steht, sondern daß Hefen- und Spaltpilze eng zusammenhängen. Für ihn existieren hier keine Gattungen und Arten. Hefenzellen und Bakterien seien losgetrennte Glieder einer Mutterpflanze und führen ein selbständiges Dasein.

REESS (1) ist im Jahre 1870, ebenso wie sein berühmter Lehrer A. DE BARY, der Anschauung, daß die Alkoholhefen überhaupt nichts mit den Schimmelpilzen oder anderen Pilzen zu tun haben, sondern selbständige Organismen sind. Er beruft sich besonders zur Bekräftigung seiner Auffassung auf seine Beobachtungen und auf die von DE SEYNES kurz zuvor entdeckte Endosporenbildung bei den Hefenpilzen (s. S. 24), welche, wie er meint, ferner für deren Selbständigkeit spricht.

Alles dies half jedoch nicht. Schon im folgenden Jahre teilt BÉCHAMP (1) mit, daß sich, wenn die „Essigmutter" in mit kohlensaurem Kalk versetzten zuckerhaltigen Flüssigkeiten ausgesät wird, Bakterien entwickeln, welche Butter-, Milch- und Essigsäure bilden; wird aber der kohlensaure Kalk nicht zugesetzt, bekommt man Zellen, die eine Alkoholgärung erzeugen, mit anderen Worten: Essigbakterien wandeln sich in Alkoholhefe um. In demselben Jahre teilt TRÉCUL (1) mit, daß Eiweißkörper in Alkoholhefe umgebildet werden können und daß dasselbe mit den Milchsäurebakterien der Fall sei. FRÉMY (1) ist teilweise derselben Meinung und glaubt, daß die Hefe sich aus den Eiweißkörpern in den Fruchtsäften bilde. Im Jahre 1872 erzählt TRÉCUL (2), daß er jetzt *Penicillium*-Sporen in Hefe umgebildet habe. DUVAL (1) kommt zwei Jahre später zu dem Resultate, daß Hefe in Milchsäurebakterien u. a.

umgebildet werden könne, wenn sie in einer passenden Weise gezüchtet werde. Ch. Robin (1) glaubt, daß *Mycoderma cerevisiae* die Stammpflanze der Hefe sei und daß *Penicillium glaucum* sich aus beiden entwickeln könne.

Wir sind jetzt zum Jahre 1876 gelangt, in welchem Pasteur sein Werk „Études sur la bière" herausgibt, das ja auch die Frage über den Ursprung der Hefe behandelt. Obwohl er zeigt, daß alles, was man früher von dem Polymorphismus der Hefe angeführt hat, unrichtig ist, ist er nichtsdestoweniger selbst in dieser Richtung hin unklar, was aus
10 seinen Auseinandersetzungen in dem oben genannten Werke S. 155 und S. 177 ersichtlich ist. Unglücklicherweise bezeichnet Pasteur mit „levure" bald echte, sporenbildende Saccharomyceten, bald nur sproßbildende Pilze. Wenn er also an einer Stelle sagt, daß das auf den Trauben allgemein vorkommende *Dematium* Hefenzellen, „levure", entwickelt, so
15 kann dies richtig sein, wenn er unter Hefenzellen nur Sproßzellen im allgemeinen versteht. Wenn er aber an anderer Stelle in demselben Buche sagt, daß *Dematium* „levures alcooliques", Alkoholhefenpilze, entwickelt, und daß man darin eine Bestätigung der Vermutungen früherer Forscher hat, daß die Hefenpilze nur losgetrennte Organe einer mehr
20 oder minder komplizierten Pflanze sind, so spricht er hier eine ganz andere Auffassung aus als oben zuvor. Man sieht, sein Standpunkt ist in hohem Grade unklar; eine exakte Reinzuchtmethode und wirkliche Versuche fehlten ihm.

Chamberland (1) teilt im Jahre 1879 das Resultat einiger von ihm
25 angestellter Versuche mit, um Aufklärung darüber zu bekommen, inwieweit *Dematium* auf den Früchten Alkoholhefenpilze zu entwickeln vermag oder nicht. Wir werden mit ein paar Worten diese Versuche näher besprechen. Daß die Saccharomyceten sich gewöhnlich auf den reifen Trauben finden, ist eine bekannte Sache. Während die Beeren noch un-
30 reif waren, wurden sie in Glasbehälter eingeschlossen, bis sie ganz reif wurden. Er ging von den folgenden Betrachtungen aus: Wenn die Trauben unreif sind, findet sich keine Hefe auf ihrer Oberfläche. *Dematium* aber findet sich in großer Menge während der ganzen Zeit: wenn dieses *Dematium*, während die Trauben zur Reife gelangen und der Nährboden
35 also sich ändert, wirklich in Alkoholhefen umgebildet wird, so muß auch eine Gärung entstehen, wenn die in dem Glasbehälter zur Reife gebrachten Trauben in eine passende Flüssigkeit gebracht oder in ihrem eigenen Saft zerquetscht werden, ebenso gut wie dies mit den nicht eingesperrten Trauben der Fall ist. Falls dagegen *Dematium* nicht Alkohol-
40 hefenpilze zu entwickeln vermag, werden die eingesperrten Trauben keine Gärung erzeugen. Das Resultat war, daß keine der eingesperrten Trauben Alkoholhefenzellen enthielt, während dies dagegen bei den allermeisten der nicht eingesperrten der Fall war. Chamberland schließt aus diesem Versuche, daß *Dematium* nicht Alkoholhefenpilze entwickelt,
45 und daß die Keime letzterer, welche sich auf den süßen Früchten finden, von dem Staube der Luft herrühren.

Besonders infolge der Untersuchungen von A. de Bary und Reess wurde nun bis 1883 allgemein angenommen, daß die Saccharomyceten selbständige Pilze sind. In diesem letzteren Jahre aber greift Brefeld (1)
50 die Frage wieder auf. Unter „Hefe" versteht er alle Sproßpilze; er unterscheidet nicht die sporenbildenden, die Saccharomyceten, von den nicht sporenbildenden. Er hebt einseitig als Charakter der „Hefen" die endlose Sprossung hervor. Da er bei den Sporen der Brandpilze unter

gewissen Umständen eine Vermehrung durch Sprossung (s. Bd. I, S. 217 bis 218) wie bei den Saccharomyceten findet, gelangt er zu der Auffassung, letztere seien gleichfalls keine selbständigen Pilze sondern nur Entwicklungsstufen gewisser anderer, höherer Formen. Eine genauere Anweisung, wo diese Stammformen dann zu suchen sind, gibt er nicht. 5 Ebenso wie seine Vorgänger gibt er nur Behauptungen, aber keine Beweise.

Infolge dieser Mitteilungen wurde von verschiedenen Verfassern in den gärungstechnischen Zeitschriften und anderswo allgemein behauptet, daß der Beweis jetzt gegeben worden sei, daß die Saccharomyceten und 10 die Brandpilzkonidien ganz dasselbe seien. Mit anderen Worten: die große, wichtige Frage über die Abstammung der eigentlichen Alkoholhefen sei gelöst. Dies war aber durchaus nicht der Fall; im Gegenteil, es war nur die Verwirrung größer als früher geworden.

In demselben Jahre sprach HARZ (1) seine Anschauung über die 15 Sachlage aus. Er ist mit BREFELD darin einverstanden, daß die Saccharomyceten keine selbständigen Pilze sind; er glaubt aber nicht, daß *Sacch. cerevisiae* von Brandpilzen abstamme. Er spricht es als eine Möglichkeit aus, daß diejenige höhere Pilzform, aus welcher *Sacch. cerevisiae* hervorgegangen sei, ausgestorben sei; er hofft aber doch, daß man sie noch 20 finden werde.

A. DE BARY (2) bedauert „die Konfusion, welche BREFELD neuerdings in die Geschichte der ‚Hefepilze‘ zu bringen sich bemüht hat“. Er spricht auch von HALLIER's „extravagant pleomorphistischen Bestrebungen“, will aber diese nicht weiter besprechen, weil sie „nur der 25 wissenschaftlichen Chronique scandaleuse angehören“.

Im Jahre 1886 veröffentlicht LUDWIG (1) seine Beobachtungen über Alkoholgärung und Schleimfluß an lebenden Bäumen und über diejenigen Organismen, welche solche Erscheinungen verursachen. Er spricht sich hier über einen wahrscheinlichen genetischen Zusammenhang zwischen 30 drei im Schleimflusse einer Eiche gefundenen Organismen aus, und zwar einem *Saccharomyces*, einem *Oidium* und einem *Endomyces*. Indessen zeigte E. CHR. HANSEN (2), daß dieser genetische Zusammenhang nicht besteht, und später gelangte auch BREFELD zu demselben Resultate.

BREFELD (2) tritt im Jahre 1891 wieder auf. Er spricht u. a. 35 folgendes aus: „Hiernach sind die *Saccharomyces*-Formen als nichts anderes anzusehen wie alle übrigen Konidien höherer Pilze, welche sich in unendlichen Generationen durch Sprossung in Hefenform gleich selbständigen Pilzformen vermehren können, ohne in die höhere Form überzugehen; sie haben vor diesen voraus, daß die Konidienbildung noch nicht ganz 40 vollendet ist, und daß unter Umständen eine spärliche endogene Sporenbildung in den Konidien eintreten kann.“ Es ist hierbei zu bemerken, daß sich *Saccharomyces*-Arten finden, deren Zellen in einer Menge von mehr als 99 Proz. Sporen bilden, was doch nicht eine spärliche Sporenbildung genannt werden kann. Die Hauptsache aber ist, daß eine 45 endogene Sporenbildung überhaupt existiert. Er ist ferner der Meinung, daß die Entdeckung der höheren Pilze, zu welchen die Saccharomyceten nach seiner Auffassung als Konidien gehören, „lediglich eine Frage der Zeit ist“. Hierdurch wird also das Ganze ins Unbestimmte hinausgeschoben. 50

Das folgende Jahr glaubt MOELLER (1), die merkwürdige Entdeckung gemacht zu haben, daß die Saccharomyceten gar keine Sporenbildung besitzen; was man als Sporen angesehen hat, sind nach seiner Meinung

nur Fetttröpfchen. Das Genus *Saccharomyces* sei deshalb zu streichen. Daß seine Auffassung eine ganz unrichtige war, zeigte E. Chr. Hansen (4); und Moeller (2) gibt dies später auch zu: die Saccharomyceten besitzen wirklich Endosporen.

5 Wir sind jetzt bei einer Periode angelangt, in welcher die unrichtigen Ideen früherer Zeiten aufs neue besonders stark emporblühen. Die Veranlassung gibt ein Japaner, Takamine, welcher in einer Patentschrift mitteilt, daß der bei der Sakéfabrikation in Japan verwendete Schimmelpilz, *Aspergillus Oryzae*, Hefenzellen entwickle, welche die für die 10 Fabrikation von Saké notwendige Alkoholgärung hervorrufen. Schon im Jahre 1876 hatte übrigens Korschelt (1) ganz dasselbe behauptet. Jetzt, im Jahre 1895, kommt diese alte Geschichte wieder auf. J. J. Juhler (1) teilt nämlich mit, daß es ihm gelungen ist, nachzuweisen, daß eine *Aspergillus*-Art unter gewissen Bedingungen alkoholbildende *Saccharomyces*-15 Zellen hervorbringt. Erst später bekam man die Aufklärung, daß dies *Aspergillus Oryzae* war. Er hegte also die Meinung, nicht nur eine Hefenzellbildung sondern zugleich eine Endosporenbildung in den Hefenzellen nachgewiesen zu haben. Alfr. Jörgensen bestätigt gleichzeitig die Richtigkeit der Entdeckung Juhler's.

20 Ebenso wie E. Chr. Hansen (1 u. 3) schon in den Jahren 1883 und 1892 die Brefeld'schen Behauptungen widerlegt und hervorgehoben hat, daß Diskussionen über Möglichkeiten auf diesem Gebiete nach allem, was vorausgegangen war, als unnütz angesehen werden müssen, und daß das, was jetzt gefordert werden muß, exakte Versuche sind, so ergreift 25 er (5) auch jetzt das Wort und zeigt u. a., daß man nicht, selbst wenn die Untersuchungen Juhler's richtig seien, solche Schlußfolgerung ziehen kann, wie dieser es getan hat. In denjenigen Abhandlungen, welche Hansen im Laufe der Jahre in betreff der vorliegenden Frage veröffentlichte, hebt er immer wieder das hervor, was für eine wirkliche Beweis-30 führung notwendig ist, und daß mit bestimmten, durch Fachleute kontrollierbaren Arten durchgeführte Versuche verlangt werden müssen.

Alfr. Jörgensen (1) und Juhler (2) veröffentlichen danach neue Mitteilungen. Ersterer meint, das Problem in betreff der Abstammung der Weinhefe gelöst zu haben, indem er auf den Trauben dematium-35 artige Pilze gefunden habe, welche unter gewissen Bedingungen in ihrem Innern Sporen zu bilden vermögen, die, in eine zuckerhaltige, gärungsfähige Nährflüssigkeit gebracht, sich durch Sprossung vermehren und in echte Saccharomyceten sich umbilden. Und ferner teilt er mit, daß dies auch für einen Teil der auf den Trauben auftretenden *Aspergillus*- und 40 *Sterigmatocystis*-Arten Gültigkeit habe, deren Konidien in Hefenzellen umgewandelt werden sollen, welche eine Alkoholgärung hervorrufen.

Wir werden nicht länger bei diesen grundlosen Behauptungen verweilen; sie haben jetzt ein nur untergeordnetes und historisches Interesse. Sie sind schon längst widerlegt worden und haben nicht der Wissen-45 schaft gefrommt. Unmittelbar nach dem Erscheinen der oben genannten Veröffentlichungen teilt Wehmer (1) mit, daß es ihm niemals gelungen ist, eine Entwicklung von Hefenzellen bei *Aspergillus Oryzae* zu beobachten. Kosai und Yabe (1) finden keine genetische Verbindung zwischen *Aspergillus Oryzae* und dem bei der Sakéfabrikation tätigen *Saccharomyces*, 50 und dasselbe geben auch Klöcker und Schiönning (1) an, welche umfassende Experimente darüber anstellten.

Etwas ganz neues teilt Sorel (1) mit; er glaubt entdeckt zu haben, es seien nicht die Konidien des *Aspergillus*, welche in Hefenzellen um-

gebildet werden, sondern letztere entstehen durch Teilung des Myceliums. Und außerdem glaubt er, die Hefenzellen wieder in *Aspergillus* umwandeln zu können, was eben das war, was bisher noch gefehlt hatte.

WORTMANN (1) gelangt zu dem Resultate, daß keine genetische Verbindung zwischen Hefe und *Dematium* oder zwischen Hefe und *Aspergillus Oryzae* existiert. Aus den Untersuchungen SEITER's (1) über die Abstammung der Saccharomyceten ging hervor, daß er zu demselben Resultate kam wie KLÖCKER und SCHIÖNNING in ihrer ersten Mitteilung, also, daß die Saccharomyceten selbständige Pilze sind.

Die Hauptarbeit KLÖCKER's und SCHIÖNNING's (2) erschien im Herbste 1896. Ihre Untersuchungen greifen weit über den Ideenkreis hinaus, in welchem die früheren Experimentatoren sich bewegt hatten, indem alle Wege geprüft werden, die auf dem jetzigen Standpunkte der Wissenschaft sich denken lassen, um die alte Frage über die Abstammung der Saccharomyceten zu beleuchten. Die Frage wurde einer eingehenden und soweit möglich allseitigen Behandlung unterworfen; die Resultate waren aber alle negativ. Es wurde durch Experimente dargetan, so durch Absperrung von Kirschen, Pflaumen und Trauben in derselben Weise, wie früher bei den CHAMBERLAND'schen Versuchen erwähnt wurde, daß bis heute keine einzige Tatsache vorliegt, die darauf hindeutet, daß die Saccharomyceten Entwicklungsglieder anderer Pilze seien. Es wurde auch dargetan, daß alle bisher erschienenen diesbezüglichen Behauptungen unrichtig sind, und daß alle Untersuchungen eben dafür sprechen, daß die Saccharomyceten selbständige Organismen sind und deshalb bis auf weiteres als solche aufzufassen sind.

Der Vollständigkeit halber werden wir noch mitteilen, daß ungefähr gleichzeitig eine Arbeit von J. OMORI (1) erschien. Er behauptet darin, daß die in dem Koji der Sakéfabrikation befindliche Hefe von den Sporen eines Brandpilzes, *Ustilago virens* Cooke, oder, wie der Verfasser ihn nennt, *Sphacelotheca virens* herrühre. CORDIER (1) säet auf nicht sterilen Trauben Hefe aus, und da er danach auf den Trauben eine Schimmelvegetation beobachtet, glaubt er, letztere habe sich aus der Hefe entwickelt. Und endlich ist noch im Jahre 1902 ODIN (1) mit der alten Geschichte aufgetreten, nämlich daß die *Penicillium*-Konidien, wenn sie alt werden, sich durch Sprossung vermehren und damit weiter fortfahren, wenn sie in einen zuckerhaltigen Saft oder auf Mohrrüben- oder Kartoffelscheiben übertragen werden. Diese Mitteilung wurde der französischen Akademie der Wissenschaften vorgelegt und zur Veröffentlichung gebracht.

Heutzutage ist man nun so weit, daß keiner mehr es der Mühe wert hält, solche Behauptungen von Umbildungen, wie die im vorhergehenden erwähnten, zu widerlegen. Die in dieser Angelegenheit verwendete große kritische Arbeit hat jedenfalls das Gute gehabt, daß der Blick dafür geschärft worden ist, was von Beweisführung und exakter Methode gefordert werden kann und muß. Wird aber hiermit dieses Phantom für immer begraben sein? Es ist nicht wahrscheinlich, denn es hat sich hier ebenso wie in der Frage der Generatio aequivoca als eine Krankheit erwiesen, die immer wieder ausbricht. Es hat nicht nur in der wissenschaftlichen Mykologie sondern auch in der Gärungstechnik eine große und in hohem Grade zerstörende Rolle gespielt und an mehr als einer Stelle eine wichtige Belehrung dahin gegeben, wie man die Sache — nicht in Angriff nehmen soll. Das Haupresultat ist das geworden, daß bis heute keine einzige Tatsache vorliegt, welche zeigt, daß die Saccharomyceten Entwicklungsglieder anderer Pilze seien, und daß

alle bisher vorgebrachten Behauptungen bei der Nachprüfung sich als falsch erwiesen haben. Die Wahrscheinlichkeit spricht vielmehr dafür, wie A. de Bary seinerzeit betont hat, daß die Saccharomyceten selbständige Organismen sind, ebenso gut wie die Exoasceen, an welche 5 sie sich auch am nächsten anschließen, da sie dieselben morphologischen Entwicklungsglieder und keine anderen besitzen. Falls ferner die in der allerneuesten Zeit geäußerte Anschauung richtig ist, daß bei gewissen Arten eine Kopulation, also ein Sexualakt, vor sich geht, ehe die Ascusbildung stattfindet, so z. B. bei *Zygosaccharomyces*, so würde 10 dies ja außerdem ein weiterer Beweis der Selbständigkeit sein. Guilliermond (1) benutzt auch dieses Argument in betreff der Schizosaccharomyceten.

§ 32. Die grundlegenden Untersuchungen über den Kreislauf.

Derjenige Hefenpilz, dessen Kreislauf in der freien Natur zuerst 15 aufgefunden wurde, war der im 15. Kapitel genauer zu beschreibende *Saccharomyces apiculatus*. Diese Untersuchung verdanken wir Hansen. Der Name *Sacch. apiculatus* wurde von Reess dem kleinen zitronenförmigen, sporenlosen Alkoholhefenpilz gegeben, der so außerordentlich häufig in der Natur und allgemein bekannt ist. Wenn im folgenden 20 von echten Saccharomyceten oder Saccharomyceten im allgemeinen gesprochen wird, so verstehen wir darunter Alkoholhefenpilze, welche nicht nur Sprossung sondern zugleich Endosporenbildung besitzen. Da die Untersuchungen über *Sacch. apiculatus* grundlegend für die Untersuchungen über den Kreislauf der echten Saccharomyceten sind, werden wir im 25 folgenden als Einleitung einen kurzen Ueberblick über jene ersteren geben.

In den Jahren 1880—1881 teilte Hansen (6) die Ergebnisse seiner Untersuchungen über den Kreislauf der genannten Hefenart mit. Es ging daraus hervor, daß der Hauptaufenthaltsort und die Brutstätte 30 dieses Pilzes im Sommer und im Herbste die beschädigten, süßen, saftigen Früchte sind, in deren Saft er sich mit großer Ueppigkeit vermehrt; im Winter und während der Frühlingszeit ist sein Hauptaufenthaltsort dagegen der Erdboden unter Obstbäumen und Fruchtsträuchern. Von den Früchten gelangt er in die Erde teils dadurch, daß die Früchte herunter- 35 fallen, teils durch das Abspülen durch den Regen. Auch diejenigen Zellen, welche von den vielen Insekten, welche die süßen, saftigen Früchte heimsuchen, gefressen werden, gelangen mit den Exkrementen dieser Tiere in der Regel in die Erde. In betreff der Weise, auf welche der kleine Hefenpilz von dem Boden auf die Früchte hinauf transportiert 40 wird, spricht Hansen aus, daß der Wind die Hauptrolle spielt; er hebt aber sowohl in seinen ersten wie auch in seinen späteren Abhandlungen zugleich die große Bedeutung des Regens, der Insekten und anderer Tierchen in dieser Beziehung hervor, und daß der Transport von der einen Frucht zur anderen durch Hilfe der Insekten vor sich geht. Ein 45 heftiger Regen kann die nasse Erde und dadurch die Hefenzellen auf die Früchte niedriger Fruchtsträucher, z. B. Erdbeeren, hinaufspritzen. Nur während einer kurzen Zeit des Jahres spielen die Insekten eine Rolle als Transportmittel, dies gilt nicht nur in der Umgegend von Kopenhagen, wo Hansen besonders seine Untersuchungen anstellte, 50 sondern auch für den größten Teil von Europa. Der Hauptfaktor, der

Wind, ist dagegen das ganze Jahr hindurch wirksam. Mit den Staubwolken werden kolossale Mengen von Zellen umhergeführt und dadurch auf die Früchte hinaufgebracht. Es ging ferner aus den Untersuchungen Hansen's hervor, daß dieser Kreislauf der normale für die genannte Hefenart ist. Es hatte sich durch diese Untersuchungen gezeigt, daß *Sacch. apiculatus* auf den unreifen Früchten schnell abstirbt. Die Ursache hiervon fand Hansen (9) darin, daß der Pilz nur in sehr geringem Grade das Austrocknen und die Einwirkung der Sonnenstrahlen verträgt.

Wir werden jetzt die Untersuchungen über den Kreislauf der echten Saccharomyceten näher betrachten. Als Hansen seine Untersuchungen in dieser Beziehung anfing, lag eine Reihe von Studien von Brefeld und Pasteur vor, welche den Ideen, von denen Hansen seinen Ausgangspunkt nahm, zuwider liefen.

Brefeld (3) war der Anschauung, daß die Hefenpilze sich nicht nur im Verdauungskanale der Tiere vermehren, sondern daß ihre wesentlichste Brutstätte und ihr Hauptaufenthaltsort der Kot pflanzenfressender Tiere sei. Hansen zeigte, daß dies nicht richtig ist.

Daß die reifen, besonders die beschädigten Traubenbeeren zur Zeit der Weinlese reich an Hefenzellen sind, war eine bekannte Sache, seitdem man angefangen hatte, Beobachtungen über die Weingärung anzustellen, und es folgte hieraus von selbst, daß die Hefenzellen in die Erde gelangen, wenn die Beeren herunterfielen oder der Regen sie abspülte. Durch einige Versuche kam Pasteur (1) aber zu der Anschauung, daß sie einen Aufenthalt im Erdboden nicht lange vertragen und daß also letzterer nicht ihr Winteraufenthaltsort sei. Wo dieser dann gesucht werden soll, darüber teilt er nichts Bestimmtes mit. Wie man sich aus dem vorhergehenden Paragraphen erinnern wird, gelangte er zu der unrichtigen Auffassung, daß die Weinhefenzellen sich aus den braunen *Dematium*-Zellen entwickeln, welche das ganze Jahr hindurch sich auf den Weinstöcken finden.

Für seine Analysen benutzte Hansen (8) zwei Verfahren: Teils Analyse von Erdproben und anderen Substraten in der Natur und von dem Staube der Luft, teils Aussaat bestimmter Arten in die Erde unter natürlichen Verhältnissen. Als Resultat der Analysen ging hervor, daß echte Saccharomyceten zu allen Zeiten des Jahres sich in der Erde und in der Luft finden, am häufigsten aber zu der Zeit, wenn die süßen, saftigen Früchte reif sind. Die Aussaatversuche wurden mit *Sacch. cerevisiae*, *Sacch. ellipsoideus* und *Sacch. Pastorianus* unternommen. Die Hefen wurden in sterilisierte Erde in Blumentöpfen eingesät, welche im Boden im Freien eingegraben wurden. Hierdurch wurde zuverlässig festgestellt, daß die Zellen von der einen Fruchtzeit zur anderen leben. Hieran knüpft sich auch seine Beobachtung (7), daß die Zellen an der Oberfläche der Erde Endosporen bilden können. Auf Grund dieser Untersuchungen konnte Hansen schon in seinen Mitteilungen aus dem Jahre 1882 feststellen, daß der Kreislauf der echten Saccharomyceten in der Hauptsache derselbe wie für *Sacch. apiculatus* ist. Die Hauptbrutstätte sind die süßen, saftigen Früchte, der Winteraufenthaltsort die Erde. Die wichtigsten Transportmittel sind der Wind, der Regen, die Insekten und andere Tierchen.

Seine obengenannten Aussaatversuche wiederholte Hansen (10 u. 11) später sowohl mit *Sacch. apiculatus* als auch mit zum Teil denselben Saccharomyceten (nämlich *Sacch. ellipsoideus*, *Sacch. Pastorianus*, *Carlsberg*

Unterhefe Nr. 1 und einer Brauerei-Oberhefe); er wandte aber jetzt CHAMBERLAND'sche Tonröhren statt der Blumentöpfe an, um Aufklärung zu bekommen, ob die Zellen mehrere Jahre hindurch in der Erde leben können. Die Tonröhre benutzte er, um jene soweit als möglich gegen 5 Infektion und Angriffe von Tieren aus der umgebenden Erde zu bewahren. Es zeigte sich dann, daß die genannten Arten mehr als drei Jahre in der Erde leben können.

Zu dieser Zeit und später war die Lehre von der Möglichkeit einer Pleomorphie bei diesen Pilzen sehr in Fluß geraten, besonders durch 10 die Arbeiten BREFELD's. Auch die Lehre PASTEUR's von der Entwicklung der Saccharomyceten aus den braunen *Dematium*-Zellen (s. S. 144) gehört hierher. Man mußte damals auf die Möglichkeit gefaßt sein, daß jetzt lebende Stammformen dieser Hefenpilze entdeckt werden könnten und vielleicht solche Stammformen, daß die ganze Kreislaufrichtung eine 15 ganz andere werden würde als diejenige, welche die Studien über *Sacch. apiculatus* in ihren Grundlinien dargelegt hatten. Indem HANSEN hier und mehrmals in einigen seiner späteren Schriften diese Möglichkeiten hervorhob, trug er nicht nur dazu bei, daß mehrere Forscher sich auf diese Untersuchungen warfen, sondern zugleich dazu, daß von einigen 20 Seiten Versuche gemacht wurden, diejenige Theorie von dem Kreislaufe, welche er aufzubauen angefangen hatte, umzustürzen.

Es hatte nicht nur eine theoretische sondern auch eine praktische Bedeutung, die HANSEN'schen Untersuchungen zu wiederholen und zwar in erster Linie Analysen von dem Boden in den Weinbergen zu unter- 25 nehmen. So fing MÜLLER-THURGAU (1) im Jahre 1889 eine Reihe von Untersuchungen in dieser Richtung hin an. Auch er gelangte zu dem Ergebnisse, daß die Früchte die Hauptbrutstätte der Saccharomyceten sind, und daß die Zellen des Weinhefenpilzes sich das ganze Jahr hindurch in der Erde finden. Seine Analysen darüber wurden in einem 30 Weinberge bei Geisenheim unternommen. Er ist der erste, welcher Untersuchungen über die Tiefe, in welcher die Weinhefe in der Erde sich noch am Leben findet, anstellte. Er fand sie nicht nur an der Oberfläche des Bodens, sondern auch in der Tiefe, und zwar durchschnittlich 20—30 cm tief; bei 40 cm wurde keine Hefe mehr gefunden. 35 Im Sommer fand er weniger Hefenzellen an der Oberfläche als einige Centimeter weit tiefer unten. Im Anfange war MÜLLER-THURGAU der Anschauung, daß die Insekten die eigentlichen Transportmittel der Hefenzellen seien; die Bedeutung des Windes in dieser Beziehung wollte er nicht anerkennen. Er war also nur darüber mit HANSEN vollständig 40 einig, daß die Erde auch im Weinberge der normale Winteraufenthaltsort der Saccharomyceten ist und daß diese von hier auf die Brutstätten, nämlich die Trauben, gelangen. Später ist MÜLLER-THURGAU (2) jedoch zu der Erkenntnis gelangt, daß auch der Wind und der Regen bedeutsame Transportmittel sind. Er stellte gleichfalls Versuche mit Aussaat 45 von Weinhefenpilzen in Tonröhren an und gelangte zu dem Ergebnisse, daß sie von Herbst zu Herbst in der Erde leben können. MÜLLER-THURGAU spricht ferner aus, daß *Sacch. ellipsoideus* in sehr geringem Grade das Austrocknen verträgt und deshalb schnell abstirbt, wenn er sich an der Oberfläche der Traubenbeeren findet, welche dem Austrocknen 50 und dem Sonnenlichte sehr stark ausgesetzt sind. Dasselbe fand auch MARTINAND (1).

Einige Jahre später unternahm WORTMANN (2) umfassende Untersuchungen der Erde der Weinberge. Jeden 14. Tag im Verlaufe zweier

Jahre nahm er Bodenproben in derselben Parzelle. Im November und Dezember war die Anzahl der Hefenzellen die größte und die Gärung trat schnell im Moste, in welchen die Bodenproben eingebracht wurden, ein. Danach nahm die Hefenzellmenge in den Monaten Januar, Februar und März ab; im Frühjahr und besonders im Sommer wurden diese Verhältnisse immer ungünstiger und es kam immer häufiger vor, daß aus einzelnen eingebrachten Proben überhaupt keine Hefen sich entwickelten. Am allerungünstigsten erwies sich die Hefenentwicklung im Spätsommer, im Monat August und September, während dieselbe von Beginn der Traubenreife an fast plötzlich wieder lebhaft wurde. WORTMANN schließt aus diesen seinen Untersuchungen, daß die Hefenzellen während des Aufenthalts in der Erde abgeschwächt werden, daß sie dort hungern und deshalb schwächer und schwächer werden, und daß die meisten absterben. Nur die wenigen Zellen, welche den Winter in der Erde überleben und welche so glücklich sind, auf eine beschädigte Traube zu gelangen, pflanzen das Geschlecht fort. Wie besonders aus dem nachfolgenden ersichtlich ist, ist dies nicht vollständig in Uebereinstimmung mit HANSEN's Untersuchungen. Diesen zufolge sind die Verhältnisse in der Erde für die Saccharomyceten nicht so ungünstig. Rücksichtlich der Transportmittel, ist er der Meinung, daß HANSEN dem Winde eine etwas zu große Rolle zuschreibt; bei seinen Untersuchungen fand er, daß hauptsächlich die Wespen tätig sind.

Während sowohl WORTMANN als auch MÜLLER-THURGAU sich im wesentlichen an HANSEN's Theorie über den Kreislauf der Saccharomyceten schließen, machen die im folgenden genannten Forscher in einigen Punkten andere Anschauungen geltend. Besonders wurde von einer einzelnen Seite die Anschauung ausgesprochen, daß in Ländern mit einem heißen Klima, wie Italien, die Erde nicht der Hauptaufenthaltsort sei.

BOUTROUX (1, 2) hält den Nektar der Blumen, die Insekten und die unreifen Früchte für die Aufenthaltsorte der Hefenpilze vom Ende des Winters bis zur Fruchtzeit und spricht aus, daß die Insekten die Zellen von Blume zu Blume, von Frucht zu Frucht weitertragen. Es muß indessen daran erinnert werden, daß er nicht *Saccharomyces* von *Torula* unterscheidet, sondern alle diejenigen Hefenzellen, welche Gärung hervorrufen, *Saccharomyces* nennt. Die von ihm gefundenen Zellen sind deshalb wahrscheinlich bei weitem nicht immer Saccharomyceten, die meisten sind sicher *Torula*-Formen, welche in der Natur überaus verbreitet sind. Uebrigens ist es nichts Merkwürdiges, Saccharomyceten an den genannten Stellen zu finden, denn sie können ja ebenso gut dort wie anderswo abgelagert werden. Weder HANSEN (10) noch BEIJERINCK (1) konnten die Mitteilungen BOUTROUX's bestätigen. Er (3) gelangt ferner zu dem merkwürdigen Ergebnisse, daß die Insekten für Hefenzellen, welche nicht Saccharose invertieren können, eine größere Rolle als Transportmittel als der Wind spielen, während das Umgekehrte bei denjenigen Hefenzellen der Fall sei, welche Saccharose zu invertieren vermögen.

ROMMIER (1) ist der Meinung, daß *Sacch. apiculatus* in den Waben der Bienen überwintert. Aber weder BOUTROUX noch auch HANSEN, BEIJERINCK und KLÖCKER fanden hier diese oder andere Hefenzellen. Selbstverständlich ist es möglich, einzelne Hefenzellen sowie andere Mikroorganismen dann und wann wohl überall zu finden; was aber in dieser Beziehung einzig und allein Bedeutung für uns hat, sind die großen Züge und das Allgemeingültige.

Die Anschauung, daß der Darmkanal der Insekten der eigentliche Winteraufenthaltsort der Saccharomyceten sei und daß HANSEN sich geirrt habe, als er behauptet hatte, daß die Erde es sei, ist von BERLESE (1) ausgesprochen worden. Nach ihm finde die Ueberwinterung 5 (insbesondere in Italien) in den Fliegen statt. Da indessen diese Tiere in Europa im geflügelten Zustand (imago) nicht überwintern, ausgenommen die südlichsten Gegenden und deshalb also auch nicht einmal in dem größten Teil von Italien, und seine eigenen Versuche zum Teil gegen seine obengenannte Anschauung sprechen (er muß 150 Fliegen unter-10 suchen um nur eine einzige zu finden, welche *Saccharomyces* enthält), kann davon abgesehen werden. Auch in Ameisenwohnungen in hohlen Bäumen und in Holzwerk meint er, daß eine Ueberwinterung stattfinde, was ebenso bedeutungslos ist, selbst wenn seine Beobachtung richtig ist. Denn Ameisenwohnungen in hohlen Bäumen sind so selten in Verhältnis 15 zu dem ungeheuer großen Aufenthaltsort und Herde, welchen die Erde darbietet, daß selbst dann, wenn man in jeder Ameisenwohnung Saccharomyceten fände, deren Anzahl ganz verschwindend im Verhältnis zu derjenigen sein würde, welche sich in der Erde findet. Uebrigens hat KLÖCKER eine große Reihe von Untersuchungen über das Verhalten der 20 Insekten zu den Saccharomyceten angestellt und ist zu dem Ergebnisse gelangt, daß die Insekten als Ueberwinterungsort ohne Bedeutung sind, jedenfalls in Europa nördlich der Alpen.

Daß die Saccharomyceten den Darmkanal verschiedener Tiere ohne Schaden zu leiden passieren können, ist von einigen Forschern dargetan 25 worden, so z. B. von KLÖCKER und SCHIÖNNING (2) an Insekten und Vögeln, von BERLESE (1) an Insekten und von CORDIER (1) an Insekten und Säugetieren. Dieses Verhalten kann also auch zur Verbreitung der Saccharomyceten beitragen.

§ 33. Neue, weitere Ausführungen über den Kreislauf.

30 Der Ausgangspunkt und die Grundlage der im Vorhergehenden besprochenen Untersuchungen über den Kreislauf der echten Saccharomyceten waren also diejenigen Ergebnisse, welche die Untersuchungen HANSEN's über *Sacch. apiculatus* gebracht hatten. Während für diese Art die von ihm aufgestellte Theorie imstande war, alle Beobachtungen 35 zu erklären, galt dieses dagegen in mehreren Fällen nicht ohne weiteres für die eigentlichen Saccharomyceten. Bei seinen Forschungen in den Weingegenden Deutschlands fand er nämlich, daß in gewissen Perioden die Bodenproben von den Weinbergen weniger Hefenzellen, auch von Weinhefenpilzen, enthielten als ähnliche Proben von den benachbarten 40 Wiesen. Ja, in einzelnen Fällen wurde sogar in einer größeren Anzahl von Bodenproben zu 50 ccm aus den Weinbergen gar keine lebende Zelle gefunden, welche mit *Sacch. ellipsoideus* identifiziert werden konnte. Aehnliche obwohl kaum so große Unregelmäßigkeiten traten auch in einigen Analysen von Erde aus Obstgärten und Feldern in der 45 Nähe von Kopenhagen hervor. Dies führte dann HANSEN (12) dazu, seine Forschungen weiter zu vertiefen und zwar in verschiedener Weise: die Methoden wurden verschärft, die Anzahl der Analysen wurde in hohem Grade vergrößert und das Versuchsgebiet wurde ausgedehnt, so daß es ein ungeheures Gebiet umfaßte, von Skandinavien bis Süd-Italien, 50 von der Ebene bis auf die Gipfel der Hochgebirge. Die wichtigste neue

Richtung in diesen Untersuchungen waren indessen seine Studien über die sekundären Herde. Es zeigte sich in den Analysen von der Umgegend Kopenhagens, daß echte Saccharomyceten sich überall in der Erde das ganze Jahr hindurch fanden, auch an solchen Stellen, wo *Sacch. apiculatus* nicht oder ganz ausnahmsweise auftrat, nämlich weit von den Obstgärten entfernt. Erst dann, wenn die Anzahl der Analysen eine hinlänglich große war, zeigte sich, daß die Erde in den Gärten am reichsten an Saccharomyceten ist, und daß die Anzahl dieser Zellen abnimmt, je nachdem man sich mehr und mehr davon entfernt. Beispielsweise sollen hier die Zahlen einer Versuchsreihe von 200 Analysen angeführt werden: Echte Saccharomyceten wurden in der Erde unter Obstbäumen und Fruchtsträuchern in 67 Proz. der Analysen gefunden; in der Erde unter Laub- und Nadelhölzern in der Nähe der Obstgärten in 30 Proz., aber in der Erde von fernliegenden Feldern nur in 19 Proz. Ein ähnliches Resultat ergaben diejenigen Untersuchungen, welche er auf den Gebirgen anstellte, so z. B. im Harz und in den Alpen. Je höher man emporsteigt und sich von den Obstgärten entfernt, desto spärlicher werden die *Saccharomyces*-Zellen in der Erde gefunden. Daß die Verhältnisse in einem wärmeren Klima, wie z. B. in Italien, dieselben sind, zeigten auch seine neuen Analysen.

Die Ursache davon, daß man die Saccharomyceten sogar in großen Entfernungen von den Obstgärten und von den primären Brutstätten überhaupt findet, liegt teils in dem Umstande, daß sie durch ihre Endosporenbildung besser als *Sacch. apiculatus* das Austrocknen vertragen, teils aber auch darin, daß sie außer an den primären Brutstätten, den süßen, saftigen Früchten — welche übrigens nicht nur in den Gärten und Weinbergen sondern zugleich in den Wäldern und anderswo verbreitet sind — sich in weit höherem Grade als *Sacch. apiculatus* an den zahlreichen sekundären Brutstätten in der Natur vermehren. Diese sekundären Brutstätten sind die Flüssigkeiten des Bodens, welche ja ein Auszug der organischen Stoffe sind, wie Pflanzenteile, Teile von Tierchen, Mist usw. Gewiß aber ist die hier stattfindende Vermehrung sehr gering in Vergleich zu derjenigen, welche an den primären Brutstätten vor sich geht. Die sekundären Brutstätten haben eine geringere Bedeutung für *Sacch. apiculatus* als für die echten Saccharomyceten, indem die erstgenannte Art sich hier noch schlechter vermehrt als die letzteren. Die echten Saccharomyceten vertragen außerdem einen weit längeren Aufenthalt in Wasser als *Sacch. apiculatus*.

Nicht allein in der Bodenoberfläche werden die Saccharomyceten gefunden sondern auch in den dünnen Schichten von Erde, welche oberhalb der Bodenoberfläche, z. B. auf Bäumen, Mauerwerk, Steinen usw. abgelagert und gegen Austrocknen durch eine Schichte von Moos, Flechten und Algen geschützt ist. Diese Pflanzen ziehen das Wasser sehr gierig an sich und ihre unterste Schicht, welche besonders bei den Moosen aus toten Resten besteht, gibt leicht Nährstoffe an das Wasser ab. In den Laubwäldern sind die Brutstätten ferner gegen Austrocknen durch die dichten Wipfel der Bäume geschützt. Anders sind die Verhältnisse auf dem offenen Felde. Dort werden die Saccharomyceten auf den sekundären Brutstätten in der Regel einem mehr oder minder starken Austrocknen ausgesetzt sein.

Durch seine Studien über die sekundären Brutstätten und über das Verhalten der Arten zum Austrocknen fand HANSEN eine Erklärung der obenerwähnten Unregelmäßigkeiten: Finden wir die Saccharomyceten

nicht an den primären Brutstätten, den süßen, saftigen Früchten, so ist die Ursache davon die, daß Sonne, Wind und Wetter ihren Einfluß geltend gemacht haben, und wenn wir sie dagegen sogar in reichlicher Menge auf den offenen Feldern finden, so ist der Grund der, daß sich 5 hier besonders günstige sekundäre Brutstätten finden, und daß sie zugleich gegen Austrocknen geschützt sind. Die sekundären Brutstätten sind durch ihre außerordentliche Verbreitung von sehr großer Bedeutung. Eine Untersuchung des Verhaltens der Arten zur Temperatur gibt ebenfalls in mehreren Beziehungen Aufklärung über das, was in der Natur 10 vor sich geht. HANSEN fand, daß mehrere der Arten sich noch vermehren können, wenn die Temperatur der Umgebung 0° ist, aber unter diesen Umständen sind Monate notwendig zur Bildung eines einzigen Sprosses, selbst wenn die Zellen sich in einer günstigen Nährflüssigkeit finden. Im allgemeinen wird die Vermehrung hauptsächlich bei einer 15 Temperatur von 1—2° C aufhören, und damit sie eine lebhafte werde, muß die Temperatur viel höher sein. An demselben Orte finden wir deshalb zu den verschiedenen Zeiten des Jahres einen verschieden hohen Gehalt an Hefenzellen. Zur Obstreife ist er am reichsten. Zu dieser Zeit werden in der Regel nicht nur die Temperaturverhältnisse und die 20 Nahrungsquellen sondern auch die Feuchtigkeitsverhältnisse günstig sein. Unter den primären Brutstätten bietet die Erde im Herbste ihr Maximum dar. Daß die sekundären Brutstätten gleichzeitig wirksam sind, folgt aus dem Obenstehenden. Danach treten im Laufe des Jahres große Schwankungen ein, und diese sind, wie oben bemerkt, besonders da 25 recht auffällig, wo ein starkes Austrocknen stattfinden kann.

Das Hauptresultat ist also, daß die Erde, ebenso wie in betreff des *Sacch. apiculatus*, der Hauptaufenthaltsort für die Saccharomyceten im allgemeinen das ganze Jahr hindurch ist. Von ihr aus werden sie durch die Hilfe des 30 Windes, des Regens, der Insekten und anderer Tierchen auf die primären Brutstätten, die süßen, saftigen Früchte, hingeführt, um von da wieder durch Hilfe derselben Faktoren entweder an eine neue primäre Brutstätte getragen zu werden, wo die starke Vermehrung stattfindet, 35 oder sie gelangen zu einem mehr bescheidenen Dasein auf unbestimmte Zeit an einer sekundären Brutstätte. Zur Zeit der Fruchtreife spielen auch gewisse Vögel bei diesem Transport von der einen primären Brutstätte zur anderen, oft auf weite Entfernungen hin, eine wichtige Rolle, wie auch noch dadurch, daß die 40 Zellen mit den Exkrementen dieser Tiere von den primären Brutstätten in die Erde gelangen. So wie HANSEN's Theorie jetzt besonders nach seinen Untersuchungen über die sekundären Brutstätten hervortritt, gibt sie in ungezwungener Weise Aufklärung über alle bisher gemachten Beobachtungen.

45 Die Bedeutung für das praktische Brauwesen, welche den obenstehenden Untersuchungen über den Kreislauf zukommt, liegt namentlich in der Aufklärung, welche sie uns über die Entwicklungsherde der Krankheitshefenarten geben, sowie über die Wege, auf welchen diese Hefen sich in den Betrieb einschleichen. Aus dem Vorhergehenden ist 50 ersichtlich, daß der Staub der Luft zu allen Zeiten des Jahres Zellen von echten Saccharomyceten enthalten kann, darunter auch Zellen von Krankheitshefenarten. Der Boden in den Obstgärten und in den Weinbergen bietet die größte Gefahr, und zwar namentlich in jenen

Monaten, in welchen die Früchte reif sind. Durch die im vorhergehenden berührten Luftanalysen wurde dargetan, daß die Monate August bis September in Dänemark die gefährlichsten für die Brauereien rücksichtlich der Infektion mit Hefenzellen sind. Der Weg, durch welche sie in der Regel in den Betrieb gelangen, sind die offenen Kühlschiffe, sie 5 können aber auch direkt in den Gärkeller hineindringen. Wo deshalb die Verhältnisse es erlauben, die Kühlschiffe zu entfernen, ist dies unbedingt zu empfehlen. Die Ansteckungsgefahr ist jedoch, seitdem die Reinzucht eingeführt wurde, deutlich kleiner als in früheren Zeiten. Die mehr oder weniger abgeschwächten Krankheitskeime, welche auf 10 den Kühlschiffen in die Würze gelangen, werden in der Regel in den Gärbottichen von der reinen Hefe überwältigt werden; vergl. Bd. V, S. 136 u. 237.

Literatur

zum Kapitel Abstammung und Kreislauf.

*Bail, (1) Flora, 1857, Bd. 40, S. 417. — (2) J. f. prakt. Chem., 1867, Bd. 101, S. 47. *Bary, A. de, (1) Morphol. u. Physiol. der Pilze, Flechten u. Myxomyceten, 1866, S. 181. — (2) Vergl. Morphol. u. Biol. der Pilze, Mycetozoen u. Bakterien, 1884, S. 136 u. 294. *Béchamp, A., (1) Ann. de chim. et de phys., 1871, Bd. 23, S. 442. *Beijerinck, M. W., (1) Centralbl. f. Bakt., 1894, Bd. 16, S. 51. *Berlese, A., (1) Rivista di Patologia vegetale, 1896—1897, Bd. 5, Nr. 5—12 und 1897, Bd. 6, Nr. 6—10. *Boutroux, (1) Bull. de la Soc. Linn. de Normandie, 1881, Bd. 6, und 1883, Bd. 7. — (2) Ann. des sc. nat., Bot., 1884, Bd. 17, S. 144. — (3) Comptes rend. de l'Ac., 1898, Bd. 127, S. 1033. *Brefeld, O., (1) Botan. Unters. über Hefepilze, 1883. — (2) Unters. aus d. Gesamtgeb. d. Mykologie, 1891, Bd. 9, S. 149. — (3) Landw. Jahrb., 1875, Bd. 4, S. 414; 1876, Bd. 5, S. 332. *Chamberland, (1) Recherches sur l'orig. et le dévelop. des org. microsc., 1879, S. 76. *Cordier, J. A., (1) Recherches sur les levures du Vign. de Champagne. O. J., S. 51. — (2) Comptes rend. de l'Ac., 1898, Bd. 127, S. 628. *Duval, J., (1) Journ. de l'anat. et de physiol., 1874, Bd. 10, S. 489. *Frémy, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1871, Bd. 73, S. 1425. *Gilkinet, A., (1) Mém. cour. et autres mém. publ. p. l'Acad. Roy. Belgique, 1878, Bd. 26, S. 1. *Guilliermond, A., (1) Rev. génér. de Botanique, 1903, Bd. 15, S. 49. *Hansen, E. Chr., (1) Allg. Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzfabr., 1883, Bd. 11, S. 871. — (2) Centralbl. f. Bakt., 1889, Bd. 5, S. 632. — (3) Bot. Ztg., 1892, Bd. 50, S. 312. — (4) Centralbl. f. Bakt., 1893, Bd. 13, S. 16. — (5) Ebenda, 2. Abt., 1895, Bd. 1, S. 65. — (6) Hedwigia, 1880, Bd. 19, S. 75, und Comptes rendus de Carlsberg, 1881, Bd. 1, S. 159. — (7) Medd. fra Carlsberg Lab., 1881, Bd. 1, S. 322. — (8) Comptes rendus de Carlsberg, 1882, Bd. 1, S. 203. — (9) Botan. Centralbl., 1885, Bd. 21, S. 181. — (10) Ann. des sc. nat., Bot., 1890, Bd. 11, S. 185. — (11) Annals of Bot., 1895, Bd. 9, S. 549. — (12) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1903, Bd. 10, S. 1; 1905, Bd. 14, S. 545. *Harz, (1) Allgem. Brauer- und Hopfen-Ztg., 1883, Bd. 23, S. 987. *Hoffmann, H., (1) Bot. Ztg., 1860, Bd. 18, S. 41. *Juhler, J. J., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1895, Bd. 1, S. 16. — (2) Ebenda, S. 326. *Jörgensen, Alfr., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1895, Bd. 1, S. 321, und Ber. d. gärungsphys. Lab. von Alfred Jörgensen, 1895, H. 1. *Karsten, (1) Bot. Ztg., 1848, Bd. 6, S. 457. — (2) Chemismus d. Pflanzenzelle, 1869. *Klöcker, Alb. und Schiönning, H., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1895, Bd. 1, S. 777. — (2) Comptes rendus de Carlsberg, 1896, Bd. 4, S. 36. *Korschelt, O., (1) Mitt. d. Deutsch. Ges. f. Natur- u. Völkerkunde Ostasiens, 1876, H. 16, S. 240. *Kosai und Yabe, (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1895, Bd. 1, S. 619. *Kützing, Fr., (1) J. f. prakt. Chem., 1837, Bd. 11, S. 398. *Ludwig, Fr., (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1886, Bd. 4, S. 17. *Martinand, V., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1891, Bd. 113, S. 782. *Moeller, H., (1) Centralbl. f. Bakt., 1892, Bd. 12, S. 537. — (2) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1893, Bd. 11, S. 402. *Müller-Thurgau, (1) Weinbau u. Weinhandel, 1889, Nr. 40 u. 41. — (2) Jahresber. Wädensweil, 1893/94, S. 65. *Odin, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1902, Bd. 135, S. 479. *Omori, J., (1) The Botan. Mag. Tokyo, 1896, Bd. 10, Nr. 118. *Pasteur, L., (1) Études sur la bière, 1876 S. 150, 155, 176—178 u. Examen critique etc., 1879, S. 66—75. *Reess, M., (1) Botan. Unters. ü. d. Alkoholgährungspilze, 1870, S. 44. *Robin, Ch., (1) Journ. de l'anat. et de physiol., 1875, Bd. 11, S. 379. *Rommier, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1890, Bd. 110, S. 536. *Seiter, O., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1896, Bd. 2, S. 301 und Bayer. Brauer-Journ., 1896, Bd. 6, S. 145. *Sorel, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1895, Bd. 121,

S. 948. ***Trécul,** A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1871, Bd. 73, S. 1454. — (2) Ebenda, 1872, Bd. 75, S. 1169. ***Wagner,** (1) J. f. prakt. Chem., 1848, Bd. 45, S. 244. ***Wehmer,** C., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1895, Bd. 1, S. 150. ***Wortmann,** J., (1) Ber. d. königl. Lehranst. f. Wein-, Obst- u. Gartenbau zu Geisenheim a. Rh., 1896, S. 82. — (2) Ebenda, 1897/98, S. 75.

(*Manuskript-Einlauf: 16. Okt. 1905.*)

8. Kapitel.

Die Variabilität der Saccharomyceten.

§ 34. Flüchtige Variationen.

Sowohl die morphologischen als auch die physiologischen Charaktere sind der Variation unterworfen. Dies gilt nicht allein von den Mikroorganismen sondern auch von den höheren Organismen, sowohl Pflanzen als Tieren. Ebenso wie das Studium der Saccharomyceten erst dann exakt wurde, als wirkliche Reinzüchtungsmethoden aufgefunden worden waren, so daß für die Experimente der Ausgangspunkt gesichert werden konnte, so sind auch erst denjenigen Beobachtungen über die Variation Bedeutung beizumessen, welche sich von jenem Zeitpunkt an datieren. Die Grundlage unseres Wissens von der Variation der Saccharomyceten verdanken wir den Untersuchungen Hansen's. Letztere bilden zwei große Hauptgruppen: Die eine umfaßt diejenigen Variationen, welche als zufällig bezeichnet werden müssen und für welche es bisher nicht möglich war, die Bedingungen darzulegen. In der anderen Hauptgruppe sind diejenigen Variationen inbegriffen, für welche die Bedingungen bekannt sind. Die experimentellen Untersuchungen dieser letzteren Gruppe und die dadurch erreichten Resultate machen den bedeutsamsten Teil der Arbeiten Hansen's auf diesem Gebiete aus.

Von einem anderen Gesichtspunkte aus können die Variationen in flüchtige und konstante eingeteilt werden. Flüchtige Variationen sind solche, welche sich nur eine beschränkte Zeit hindurch halten und dann spontan oder durch eine bestimmte Behandlung verschwinden. Unter konstanten Variationen verstehen wir solche Variationen, die sich trotz aller Behandlung nicht wieder zur Stammform zurückbringen lassen. Wir werden mit der Besprechung der flüchtigen Variationen anfangen und verschiedene Beispiele mitteilen; ihre Zahl ist selbstverständlich ungeheuer groß.

Die Beobachtungen Hansen's in dieser Richtung hin fingen schon in jenem Zeitpunkte an, da er die Reinzucht einführte, und sie umfassen Beispiele aus beinahe allen Gebieten der Morphologie und Physiologie der Hefenzelle. Die wichtigsten teilen wir hier mit. So beobachtete er, daß eine Hefe, welche im Betriebe benutzt worden war, eine stärkere Attenuation zeigte, schlechter klärte, einen fremden Geschmack gab usw., wenn sie eine Zeitlang im Laboratorium gezüchtet wurde. Wenn sie dann wieder in den Betrieb kam, nahm sie bald danach ihre alten Eigenschaften an. Dieselbe Beobachtung ist auch von anderen Forschern gemacht worden. Ferner beobachtete er (4), daß *Carlsberg Unterhefe Nr. 1* auf Würzegelatine teils solche Kolonien entwickelte, welche aus eiförmigen Zellen bestanden, teils solche, welche wurstförmige Zellen, also von anormaler Gestalt, enthielten. Wenn diese Kolonien

jede für sich gezüchtet wurden, behielten die Nachkommen eine Zeitlang ihre charakteristische Zellgestalt, und erst nachdem die wurstförmigen Zellen einige Zeit in Würze gezüchtet worden waren, nahmen sie wieder ihre normale Eigestalt an. Auch in der Brauerei hielt die normale wurstförmige Form sich mehrere Gärungen hindurch. Ein anderes Bei- 5 spiel: *Sacch. intermedius* (— *Sacch. Pastorianus II*) entwickelt auf Würzegelatine bei 25° C Vegetationen, von welchen einige dem *Sacch. ellipsoideus*, andere dem *Sacch. Pastorianus* ähnlich sind, und dieser Unterschied hielt sich eine große Anzahl von Züchtungen hindurch, sowohl bei gewöhnlicher Zimmertemperatur als bei 25° C. 10

Die Klärfähigkeit einer Brauereihefe kann in einem bedeutsamen Grade von der vorausgehenden Züchtung beeinflußt werden (vgl. Bd. V, S. 144—145). Die Versuche HANSEN's (6) mit *Carlsberg Unterhefe Nr. 1* und *Nr. 2* zeigen dies deutlich. Bei der Züchtung dieser zwei Arten, jede für sich, in gelüfteter Würze wurden Vegetationen erhalten, 15 welche unter Brauereiverhältnissen eine gute, normale Klärung gaben. Wurden dagegen dieselben zwei Hefenarten in einer ganz ähnlichen, aber nicht gelüfteten Würze gezüchtet, so erhielt man eine Hefenvegetation, welche erst dann, nachdem sie mehrere Gärungen in der Brauerei durchgemacht hatte, wieder in normaler Weise arbeiten konnte. Die 20 Hefe *Nr. 2* kehrte jedoch schneller zu ihrem ursprünglichen Zustand als die Hefe *Nr. 1* zurück; beide waren einer vorläufigen Umbildung unterworfen worden, die eine aber in höherem Grade als die andere. Das durch die Gärung der nicht gelüfteten Würze erzeugte Bier war sehr opalisierend, und es half eine Lagerung durch längere Zeit hin- 25 durch in dieser Beziehung in der Regel nur wenig; es blieb unklar, auch nachdem die Hefenzellen sich niedergeschlagen hatten und es mehrere Tage hindurch gewöhnlicher Zimmertemperatur ausgesetzt gewesen war. Dies galt besonders von dem mit *Carlsberg Unterhefe Nr. 1* vergorenen Biere. Ueber Variation in bezug auf Klärfähigkeit macht 30 auch ALFR. JÖRGENSEN (1) Mitteilung. Er beobachtete nämlich, daß eine auf Gelatine aufbewahrte Oberhefe eine langsamere Klärung und eine stärkere Attenuation gab als eine in Würze gehaltene. Daß chemische Faktoren hier eine Rolle spielen, ist außer allem Zweifel. Dies ist auch aus dem Folgenden ersichtlich: HANSEN beobachtete, daß 35 *Sacch. Pastorianus* (— *Sacch. Past. I*) durch anhaltende Züchtung zahlreicher Generationen in einer Lösung von Saccharose in Hefenwasser bei 32° C eine Zeitlang seine Fähigkeit verliert, den ihm eigenen unangenehmen Geschmack und Geruch in der Würze hervorzurufen (s. Bd. V, S. 202). Durch fortgesetzte Züchtung in Würze kehrt die Vegetation 40 jedoch schnell zu ihrem Ausgangspunkt zurück.

Wir können ferner unsere Beispiele von flüchtigen Variationen durch die folgenden, gleichfalls von HANSEN (2) beobachteten vermehren. Es zeigte sich nämlich, daß die Hautzellen gewisser Arten ebenso wie auch Zellen, welche von alten, in Saccharoselösung entwickelten Vege- 45 tationen abstammten, in Würzekulturen einen locker liegenden, käseartigen Bodensatz bildeten, welcher ganz verschieden von dem normalen, teigartigen war. Durch wiederholte Züchtungen in Würze kehrte wieder das normale Verhalten zurück. Eine solche käseartige Hefe kann übrigens auch gebildet werden, wenn die Hefe lange Zeit eingetrocknet 50 gewesen ist.

Im Jahre 1886 teilte derselbe Forscher (3) einige Versuche mit, in welchen reingezüchtete Unterhefenformen mit Obergärungs-

erscheinungen auftraten, welche indessen nach einigen wenigen Züchtungen wieder verschwanden, wie auch, daß typische Oberhefe mehrere Generationen hindurch sich als Unterhefe zeigen konnte. Das Ganze war also nur eine vorübergehende Aenderung. Auch früher, im 5 Jahre 1884, hatten HANSEN und KÜHLE einige Fälle beobachtet, in welchen einige Proben von *Carlsberg Unterhefe Nr. 2*, welche einige Wochen teils in Bier, teils in Würze und teils als ausgewaschene Preßhefe in einem Eisbehälter in der Brauerei aufbewahrt waren, sofort, nachdem sie der Würze in einem Gärkeller zugegeben waren, eine stürmi-10 sche Gärung mit Obergärungserscheinungen gaben. Es zeigte sich aber auch hier, daß die Vegetation recht schnell zu ihrem Ausgangspunkt zurückkehrte. In den späteren Jahren sind auch von anderer Seite ähnliche Beobachtungen gemacht worden. So teilt HENNEBERG (1) mit, daß er in der Versuchsstation in Berlin eine typische Dortmunder Unter-15 hefe hatte, welche eine Zeitlang normal und gut in den Brauereien gearbeitet hatte. Aber nach dem Verlaufe einiger Monate näherte sich die Hefe in der Schaum- und Bodensatzbildung den obergärigen Hefen. Es war nicht möglich, über die Ursache dieser Variation etwas zu sagen. Nach LINDNER (1) kehrte diese Hefe jedoch später zum normalen Ver-20 halten zurück und wurde wieder mit Erfolg in den Brauereien benutzt.

Die Größe des Enzymgehaltes der Zellen kann gleichfalls variieren; die Ernährungsweise spielt hier eine große Rolle als ursächliches Moment. Es liegen indessen keine Beweise dafür vor, daß eine Hefenart vollständig ihr Vermögen zur Enzymbildung verlieren kann, 25 so daß sie es unter günstigen Züchtungsbedingungen nicht wieder zu erwerben vermöchte. Auch kennt man kein Beispiel dafür, daß eine Hefe durch irgend eine Behandlung ein neues Enzym, dessen sie bis dahin ermangelte, erwerben könnte. Die von DUBOURG (1) und anderen französischen Forschern ausgesprochenen Behauptungen, daß eine Hefenart 30 durch geeignete Behandlung dazu gebracht werden könne, ein ihr bis dahin fremdes Enzym zu bilden, haben durch die von KLÖCKER (2) angestellten Untersuchungen sich als ganz unrichtig erwiesen. Damit soll jedoch nicht auch gesagt sein, daß nicht in der Natur solche Arten möglicherweise gefunden werden könnten, welche in der genannten Hin-35 sicht sich in Uebergangsstadien befinden; es soll nur hier hervorgehoben werden, daß die bisher genau untersuchten Arten sich in ihrem Verhalten zu den Zuckerarten als konstant erwiesen haben (vergl. d. 19. Kap.). In der neuesten Zeit ist WARSCHAWSKY (1) zu dem Ergebnisse gelangt, daß *Sacch. cerevisiae* (= *Sacch. cerevisiae I*) und *Schizosaccharomyces Pombe* 40 nur dann, wenn sie auf einem gärungsfähigen Nährboden gezüchtet werden, Zymase in ihren Zellen bilden, während dieses Enzym nicht entsteht, wenn jene auf einem nicht vergärbaren Nährboden gehalten werden. Ferner fand er, daß *Schiz. Pombe* auch nicht Zymase auf einem vergärbaren Nährboden hervorbringt, welcher Stickstoff in Form von 45 phosphorsaurem Ammoniak besitzt. Unter günstigen Züchtungsverhältnissen aber wird Zymase wieder gebildet; es handelt sich hier nur um eine vorläufige Abschwächung. Man hat bis jetzt nicht vermocht, auch nur einer Hefenart die Fähigkeit zu nehmen, Alkohol zu bilden, sofern die Art im Besitze einer solchen war, und es ist eine derartige Variation 50 auch nicht unter den spontanen Variationen beobachtet worden.

In betreff des Einflusses chemischer und physikalischer Faktoren auf die Bildung mehr oder minder flüchtiger Variationen sei übrigens

auf das 13. Kapitel des I. Bandes und auf das 1. Kapitel des vorliegenden Bandes verwiesen.

§ 35. Hansen's Untersuchungen über die Asporogenität. Bildung konstanter Varietäten durch Transformation.

Mit HANSEN's (5) Entdeckung der Asporogenität, also des Verlustes der Fähigkeit zur Sporenbildung, bei den Saccharomyceten beginnt im Jahre 1889 ein neuer Abschnitt in den Untersuchungen über die Variation der genannten Mikroorganismen. Er hatte die Beobachtung gemacht, daß bei *Saccharomycodes Ludwigii* eine Anzahl der Zellen die Fähigkeit zur Sporenbildung verloren, wenn sie sich eine Zeitlang auf ein und demselben Nährboden befanden. Bei einem anderen Teil der Zellen wurde das Sporenbildungsvermögen beträchtlich herabgesetzt, und ein dritter Teil endlich wurde in dieser Hinsicht gar nicht beeinflußt. Diese Variation erwies sich eine lange Zeit hindurch bei Züchtung in Würze als vererblich. Er fand ferner, daß dasselbe für mehrere andere Arten gilt, so z. B. für *Sacch. cerevisiae, Sacch. Pastorianus, Sacch. intermedius* (= *S. Pastorianus II*), *Sacch. validus* (= *S. Pastorianus III*), *Sacch. ellipsoideus* (= *S. ellipsoideus I*) und verschiedene Bierunterhefenarten, wenn sie auf Würzegelatine oder in Würze aufbewahrt werden: ein größerer oder kleinerer Teil der Zellen verliert dadurch die Fähigkeit zur Sporenbildung. Später beobachtete BEIJERINCK (1) dasselbe Verhalten bei *Schizosaccharomyces octosporus*. Er teilte zugleich mit, daß die asporogenen Zellen in mehreren Beziehungen von den sporogenen verschieden waren, u. a. war bei den ersteren die Trypsinbildung stark zurückgetreten und die Säurebildung größer als bei den sporogenen Zellen. Auch bei einer anderen Art, welche er *Sacch. orientalis* nennt, beobachtete er, daß Sporenbildung und Proteolyse zu einander in Beziehung standen, so daß die asporogenen Kolonien in einer Oberflächenplattenkultur nicht die Gelatine verflüssigten, was dagegen die sporogenen Kolonien taten. Ferner waren die asporogenen Zellen ganz ohne Glycogengehalt, während die sporogenen diese Substanz enthielten. Auch LINDNER (2) spricht von Verlust des Sporenbildungsvermögens bei Saccharomyceten durch Aufbewahrung im Laboratorium.

In den genannten Fällen handelt es sich teils um flüchtige, teils um konstante Varietäten. In einigen Fällen gelang es nämlich HANSEN, die asporogenen Zellen des *Sacch. Ludwigii* wieder sporogen zu machen, und zwar durch Züchtung in einer dextrosehaltigen Nährflüssigkeit. In anderen Fällen aber zeigten sowohl dieses Mittel als auch andere Züchtungsverfahren sich ohne Wirkung: die Zellen verblieben asporogen. In diesem Zusammenhange kann mitgeteilt werden, daß KLÖCKER (1) auch fand, daß eine Vegetation von *Sacch. Marxianus*, welche nur wenige Sporen erzeugte, durch Züchtung in dextrosehaltiger Nährflüssigkeit ihre Sporenbildungsfähigkeit bedeutend verstärkte.

Im Jahre 1883 zeigte HANSEN (1), daß die Sporen eine stärkere Erhitzung als die vegetativen Zellen vertragen. Von diesen Untersuchungen hat BEIJERINCK (1) seinen Ausgangspunkt genommen, als er versuchte, eine Zucht, die im Augenblicke nur wenige Sporen gibt, zur lebhaften Sporenbildung zu bringen. Es handelt sich indessen hier nicht um eine festgelegte Methode, sondern es ist die Behandlung der verschiedenen Kulturen eine verschiedene, man muß in jedem Falle pro-

bieren. Beijerinck macht den Fehler, das Ergebnis seiner Versuche eine Regeneration zu nennen. Es handelt sich aber nur um eine Auswahl derjenigen Individuen, welche ihr Sporenbildungsvermögen nicht verloren haben. Es kann also von einer verlorengegangenen Fähigkeit des Individuums gar nicht die Rede sein.

Wir wollen jetzt die grundlegenden Versuche Hansen's besprechen, in denen er **durch die Einwirkung bestimmter äußerer Faktoren die Bildung dauernd asporogener Varietäten hervorrief.** Es war dies in demselben Jahre 1889, in welchem er die obenerwähnten spontan asporogenen Varietäten von *Sacch. Ludwigii* beobachtete. Bei seinen Untersuchungen über die Temperaturgrenzen für die Sprossung und für die Sporenbildung bei den Saccharomyceten hatte er die Beobachtung gemacht, daß das Temperaturmaximum der ersteren Funktion immer einige Grad höher liegt als das Temperaturmaximum der letzteren, und daß das Temperaturminimum für die Sprossung einige Grad niedriger als das Temperaturminimum für die Sporenbildung ist. Dieser von ihm aufgestellte Satz gilt als Gesetz für alle echten Saccharomyceten. Wie man sich aus dem 1. Kapitel dieses Bandes, S. 25, erinnern wird, war Klebs der Anschauung, daß jenes Gesetz für alle Pilze überhaupt gelte, was sich jedoch als unrichtig erwiesen hat. Die mit diesem Gesetze in Verbindung stehende und im Nachfolgenden beschriebene Variation hat wieder ihre Begrenzung, so daß der von Hansen dafür ermittelten Gesetzmäßigkeit nur für das Genus *Saccharomyces* im Sinne Hansen's eine allgemeine Gültigkeit zugeschrieben werden kann.

Hansen stellte die Frage: was wird geschehen, wenn man die *Saccharomyces*-Arten bei einer zwischen jenen zwei Maxima oder zwischen den zwei Minima liegenden Temperatur züchtet? Und wird das Resultat in beiden Fällen dasselbe sein? Es zeigte sich, daß letzteres nicht der Fall war; denn es fand eine merkwürdige Umbildung der Art durch Züchtung bei einer zwischen den zwei Maxima liegenden Temperatur statt, eine Umbildung, welche dagegen nicht durch Züchtung bei einer zwischen den zwei Minima liegenden Temperatur erreicht werden konnte. Diese Umbildung bestand darin, daß der *Saccharomyces*-Vegetation die Fähigkeit zur Sporenbildung vollständig verloren geht, und zwar dann, wenn letztere durch zahlreiche Generationen hindurch in der Nährflüssigkeit bei der besagten Temperatur gezüchtet wird. Es ergab sich ferner, wie zu erwarten war, daß nicht alle Individuen einer Vegetation genau dasselbe Temperaturmaximum besitzen. Wenn man Versuche anstellt, um das Temperaturmaximum einer Art ausfindig zu machen, wird dasselbe ja für diejenigen Individuen bestimmt, welche das höchste Maximum besitzen. Es können sich aber auch Individuen vorfinden, welche ihr Temperaturmaximum ein wenig niedriger haben. Man wird deshalb bei den Umbildungsversuchen solchen Individuen begegnen können, welche also anscheinend bei einer niedrigeren Temperatur umgebildet werden können als bei dem für die Sporenbildung gefundenen Maximum; in der Wirklichkeit aber ist die Ursache die, daß sie derjenigen Gruppe von Individuen angehören, welche das niedrigere Temperaturmaximum der Art besitzt, und die Umbildung geht also auch in diesem Falle bei einer zwischen den zwei Maxima für die Sporenbildung und für die Sprossung liegenden Temperatur vor sich. Man kann deshalb im allgemeinen sagen, daß die genannte Umbildung durch Züchtung bei einer Temperatur in der Nähe des Temperaturmaxi-

mums für die Sproßbildung vor sich geht. Der Ausgangspunkt für diese Umbildungsversuche wird von einer jungen, kräftigen, auf normale Weise in Würze bei einer günstigen Temperatur gezüchteten Vegetation genommen. Es wird von ihr eine neue Zucht in Würze bei einer zwischen dem Temperaturmaximum für die Sporenbildung und dem Temperaturmaximum für die Sprossung liegenden Temperatur angelegt. Diese Temperatur ist ja für die verschiedenen Arten eine verschiedene. Wenn diese Züchtung einige Zeit in der Weise fortgesetzt worden ist, so daß täglich von der vorhergehenden, bei der hohen Temperatur gezüchteten Vegetation eine Durchschnittsprobe genommen wird, welche in einen neuen Würzekolben bei derselben Temperatur übergeführt wird, und die Zuchten täglich mehrmals geschüttelt werden, bilden sich asporogene Vegetationen. Die dazu erforderliche Anzahl von Züchtungen ist für die verschiedenen Arten eine verschiedene. Auf diese Weise stellte Hansen konstant asporogene Varietäten von allen zur Gattung *Saccharomyces* gehörigen geprüften Arten dar; dagegen gelang es nicht, die Gattungen *Pichia*, *Willia* und *Saccharomycodes* durch diese Behandlung umzubilden.

Um den Gang dieser Varietätenbildung zu beleuchten, stellte Hansen (8) später besondere Untersuchungen an. Das Hauptresultat kann im folgenden zusammengefaßt werden: Der Ausgangspunkt war immer eine einzige Zelle der betreffenden Art, in einigen Fällen eine vegetative Zelle, in anderen eine Spore. In allen Fällen war es eine Vegetation, welche eine sehr reichliche Sporenbildung besaß und in welcher es nicht möglich war, bei der schärfsten Analyse eine einzige asporogene Zelle zu entdecken. Um die Sporenbildungsverhältnisse in den verschiedenen Stadien während der Behandlung zu untersuchen, unternahm er Plattenzuchten in der Weise, daß die Zellen an der Oberfläche von Würzegelatine mittelst eines Platinpinsels aufgestrichen wurden. Die herangewachsenen Kolonien wurden dann, wenn ihre Größe es erlaubte, direkt auf feuchte Gipsblöcke zur Sporenbildung aufgetragen. Diejenigen Kolonien, welche für diese Behandlung zu klein waren, wurden in Würze eingetragen, und erst die darin erzeugte Bodensatzhefe wurde auf die Gipsblöcke gebracht. Die Hauptversuche wurden teils mit *Sacch. Pastorianus* (= *Sacch. Past. I*) bei 32 ° C, teils mit Weinhefe *Johannisberg II* bei 36° C angestellt. Als Beispiel des Ergebnisses der Behandlung der erstgenannten Hefe in den verschiedenen Stadien sei hier folgende Tabelle mitgeteilt:

Im 2. Stadium wurden 1 Proz. konstant asporogene Zellen gefunden
„ 4. „ „ 60 „ „ „ „ „
„ 7. „ „ 100 „ „ „ „ „

Jedes Stadium stellt die Kultur während 24 Stunden vor.

Zur Entscheidung der grundlegenden Frage, ob in der Bildung dieser asporogenen Varietäten eine Selektion oder eine Transformation (vgl. Bd. I, S. 367) vorliege, stellte Hansen besondere Untersuchungen mit der Hefe *Johannisberg II* an. Es war absolut unmöglich, in einer normalen Vegetation auch nur eine Zelle aufzufinden, die bei normaler Züchtung nicht eine sporogene Variation hervorbrachte. Der Ausgangspunkt war eine einzige Zelle, entweder eine vegetative Zelle oder eine Spore. Dieselbe Vegetation, mit welcher der Versuch angefangen wurde, analysierte man in der Weise, daß wenigstens 1000 Zellen isoliert und die von ihnen erzeugten Vegetationen auf Sporenbildung geprüft wurden. In allen Fällen gaben sie eine reichliche Sporenbildung. Ferner zeigten die Versuche, daß, sobald die Behand-

lung angefangen wird, die Zwischenformen, die vorläufig asporogenen Formen, auftreten. Solche wurden aber niemals in der Vegetation des Ausgangspunktes gefunden, und ihre Entstehung muß also auch der Behandlung zugeschrieben werden. Endlich ist die beschriebene Variation eine allgemeine Erscheinung, welche immer hervortritt, wenn die Zellen der in Rede stehenden Behandlung unterworfen werden. Als Resultat, sowohl der Analysen des Ausgangspunktes als derjenigen der fortgesetzten Stadien der Behandlung, geht also deutlich hervor, daß die während der Behandlung erscheinende Variation von einer Transformation, einer Umbildung, herrührt. Man hat hiergegen u. a. anführen wollen, daß alle Zellen den gleichen Wert haben, so daß, falls wirklich eine Umbildung stattfände, auch alle Zellen gleichzeitig umgebildet werden müßten. Dies ist aber nicht richtig. Die Zellen haben bei weitem nicht alle den gleichen Wert: der augenblickliche Zustand, wenn die Behandlung beginnt, ist höchst verschieden in Hinsicht auf Alter, Ernährung usw. Infolgedessen kann die Umbildung nicht gleichzeitig bei allen Individuen vor sich gehen.

Besonders eigentümlich ist das Verhalten, welches Hansen auch experimentell behandelt, nämlich, daß selbst dann, wenn der Ausgangspunkt des Versuches eine einzige vegetative Zelle oder Spore ist, doch folgende drei Kategorien während der Behandlung erscheinen: sporogene Zellen, vorläufig asporogene Zellen und konstant asporogene Zellen. Aus den zwei ersten Kategorien kann man wieder eine einzelne Zelle herausnehmen, welche wieder alle drei genannten Kategorien erzeugt. Hieraus ist auch ersichtlich, daß es eben eine Transformation ist, welche stattfindet, indem diese Zwischenformen, welche anfangs asporogen sind, aber ohne Behandlung wieder sporogen werden, erst nach Behandlung während einer längeren Zeit konstant asporogen werden.

In betreff der Bedingungen für die Umbildung konnte man sich denken, daß die folgenden Faktoren in Betracht kommen könnten: die chemische Zusammensetzung der Nährflüssigkeit, die durch das Schütteln des Kolbens verursachte Erschütterung, die Lüftung der Nährflüssigkeit und die Temperatur. Als Resultat seiner Versuche ging indessen folgendes hervor: Eine Nährflüssigkeit von bestimmter chemischer Zusammensetzung ist ebensowenig wie die Erschütterung notwendig. Auch die Lüftung vermag ohne die hohe Temperatur nicht die Umbildung hervorzurufen. Sowohl von der Nährflüssigkeit als auch von der Erschütterung und der Lüftung gilt indessen, daß sie insofern eine indirekte Bedeutung haben können, als sie mehr oder weniger stark die Vermehrung fördern. Die hohe Temperatur zeigte sich dagegen als der wesentlichste und absolut notwendige Faktor.

Während in den eben berichteten Versuchen Nährflüssigkeiten zur Züchtung angewendet wurden, stellte Hansen auch Versuche mit festen Nährböden an. Es zeigte sich hier, daß mehrere Arten beim Stehenlassen auf Würzegelatine bei 25 ° C oder bei Zimmertemperatur konstant asporogene Zellen erzeugten, und es ist anzunehmen, daß chemische Faktoren in diesem Falle wirksam gewesen sind. Bei 32 ° und 34 ° C bildete *Sacch. Pastorianus* auf Würzeagargelatine, wenn die Kulturen in derselben Weise wie in den Versuchen mit Nährflüssigkeiten geführt, d. h. neue Impfungen in kurzen Zwischenräumen unternommen wurden, konstant asporogene Zellen, was dagegen nicht auch dann der Fall war, wenn die Kultur ruhig stehen gelassen wurde. Hier zeigte sich also die hohe Temperatur auch als umbildender Faktor.

Die ältesten der von den verschiedenen Arten dargestellten asporogenen Varietäten zählen jetzt mehr als 16 Jahre und haben sich trotz zahlreicher Züchtungen unter sehr verschiedenen Verhältnissen fortwährend konstant asporogen erhalten.

Es hat sich als eine Regel erwiesen, daß gleichzeitig mit dem Ver- 5 luste der Sporenbildung auch die Fähigkeit zur Hautbildung verloren geht. Bei einigen Arten wurde zugleich beobachtet, daß die Varietät eine größere Vermehrungsfähigkeit als die Stammform besaß, möglicherweise gilt dies für alle Arten. Ebenso haben bei der asporogenen Varietät auch größere Abweichungen in der Größe der Alkoholbildung 10 sich gezeigt. Da die Hautzellen bei den Saccharomyceten, wie auf S. 18 erwähnt, die Fähigkeit besitzen, Alkohol in Kohlensäure und Wasser umzusetzen, was die Bodensatzhefenzellen nicht können (wenigstens nicht, wenn die Flüssigkeitsschicht hinlänglich tief ist), wird die Alkoholmenge einer von einer asporogenen und also dadurch hautlosen Varietät 15 vergorenen Würze beim Stehenlassen nicht nennenswert verringert werden, wenn sie in solchen Kolben (z. B. Pasteurkolben) aufbewahrt wird, in welchen keine Verdunstung stattfindet.

Wir wollen endlich außer dem bei *Saccharomycodes Ludwigii* auf S. 159 erwähnten Beispiel einer zufällig entstandenen konstanten 20 Variation noch die von Lepeschkin (1) beobachtete und schon auf S. 21 besprochene Mycelbildung bei *Schizosaccharomyces Pombe* und *Schiz. mellacei* nennen. Er teilt nichts über die Bedingungen ihres Auftretens mit, sagt aber, daß sie durch zahllose Generationen hindurch konstant sei und unter keiner Bedingung zur einzelligen Stammform zurück- 25 gebracht werden könne.

§ 36. Hansen's Untersuchungen über Oberhefe und Unterhefe.

Von besonderem Interesse sind die neuesten Untersuchungen Hansen's (9) über die Variationen auf dem Gebiete der Gärungserscheinungen, nämlich über das Auftreten von Oberhefenzellen in 30 einer typischen Unterhefe und von Unterhefenzellen in einer typischen Oberhefe. Er hatte, wie schon auf S. 157 erwähnt worden ist, früher beobachtet, daß gewisse Unterhefenarten eine Zeitlang, nachdem sie bei niedriger Temperatur aufbewahrt waren, Obergärungserscheinungen zeigen konnten. Im Anschluß daran stellte er besonders um- 35 fassende Versuche mit *Sacch. turbidans* (= *Sacch. ellips. II*) an. Es wurde bei 0.5° C eine Spur einer jungen, kräftigen Vegetation in Freudenreich-Kölbchen eingetragen, die mit einer dünnen Würzeschicht beschickt waren; die Kulturen wurden nach Verlauf von 3 und 5 Monaten untersucht. Eine Durchschnittsprobe wurde in Würze in Probiergläsern aus- 40 gesät und zeigte immer deutliche Obergärungserscheinungen; alle oder die allermeisten Zellen waren also jetzt Obergärungszellen. Probiergläser wurden deshalb verwendet, weil es zur unterscheidenden Beobachtung von Unter- und Obergärungserscheinungen sich als notwendig erwiesen hat, die Gärung in einer hohen Würzeschicht vor sich gehen 45 zu lassen. Eine mit 150 Zellen angestellte Probe zeigte, daß unter ihnen keine einzige Unterhefenzelle war. Die Frage war jetzt, ob bei der niedrigen Temperatur eine Umbildung stattgefunden habe. Um hierüber Klarheit zu bekommen, unternahm er eine Analyse der für die Züchtung bei 0.5° C benutzten Vegetation. Von 100 Zellen zeigte die 50

Hälfte Obergärung, die Hälfte Untergärung. Von jeder Kategorie wurde eine Reihe von Kölbchen, enthaltend eine dünne Würzeschicht, infiziert und bei 0,5° C hingestellt. Das Resultat war, daß nach Verlauf von 3—4 Monaten in den Kolben mit Unterhefenzellen keine Vermehrung zu bemerken war, dagegen aber eine deutliche Vermehrung in den Kolben mit Oberhefenzellen. Bei Züchtung der derartig behandelten Kulturen in Probierröhrchen gaben die Unterhefenzellen wieder Untergärung und die Oberhefenzellen wieder Obergärung. Es hatte also in diesem Versuche keine Umbildung sondern nur eine Auswahl stattgefunden. Als *Sacch. turbidans* im Jahre 1883 von Hansen beschrieben wurde, war er eine Unterhefe. Die Ursache der Bildung von Oberhefenzellen ist nicht bekannt. Sie ist spontan während der Zeit, als die Art im Laboratorium stand, eingetreten. Im Laufe eines Jahres haben die Unterhefenzellen sich als Unterhefe und die Oberhefenzellen sich als Oberhefe während zahlreicher Züchtungen erhalten. Von den beiden Kategorien wurden 1000 Zellen von jeder isoliert; alle riefen dieselbe Gärung wie diejenige Kategorie hervor, von welcher sie abstammten.

Versuche mit der typischen Unterhefe *Johannisberg II* zeigten, daß alte Kulturen nicht selten 70 Proz. Oberhefenzellen enthalten. Auch bei dieser Art behielten die isolierten Zellen ihren Charakter von Unter- bezw. Oberhefe durch zahlreiche Züchtungen hindurch bei.

Bei den genannten Arten ist der Uebergang von Untergärung zu Obergärung eingetreten. Es scheint, als ob der umgekehrte Weg schwieriger zu durchlaufen sei. Hansen hat auch hierüber einige Versuche mit *Sacch. validus* (= *S. Past. III*), der ja eine typische Oberhefe ist, ausgeführt. Nur in einer einzigen Vegetation fand er einige wenige Unterhefenzellen und zwar nur in einer Anzahl von 3 Proz. Die von diesen Zellen erzeugten Vegetationen wurden im Laufe von 2 Jahren durch zahlreiche Generationen hindurch unter solchen Verhältnissen gezüchtet, welche das Auftreten von Obergärungserscheinungen begünstigen. und zeigten sich nichtsdestoweniger schließlich noch immer als Unterhefe.

So wurde die alte Frage, ob die Unter- und die Oberhefenformen jede für sich selbständige Formen seien oder nicht, jetzt dahin beantwortet, daß Unterhefenzellen sich aus Oberhefenzellen entwickeln können. und umgekehrt. Unsere bisherige Auffassung (s. S. 16) ist also dadurch wesentlich geändert worden. Die zwei Formen, in welche die Art gespalten wird, können eine lange Zeit in demselben Nährboden nebeneinander leben, bis äußere Ursachen das Wachstum der einen Form begünstigen, so wie in den Versuchen mit *Sacch. turbidans* bei 0,5° C, wo die Oberhefenform sich auf Kosten der Unterhefenform ausbreitete. um diese zuletzt ganz zu unterdrücken.

Während die früher besprochenen asporogenen Varietäten, wie wir gesehen haben. durch Umbildung infolge der Einwirkung eines bekannten äußeren Faktors, der hohen Temperatur, dargestellt wurden, muß das Auftreten der Oberhefenzellen in einer typischen Unterhefe, und umgekehrt, zu derjenigen Kategorie von Variationen gezählt werden, welchen H. de Vries den Namen Mutationen (vgl. Bd. I, S. 368) gegeben hat. Hierunter versteht man all jene plötzlich entstandenen Variationen, deren Ursache man nicht kennt. In den meisten Fällen sind die Eigenschaften dieser Mutanten vererblich. Beispiele hiervon haben wir schon in unserer Beschreibung von den nicht konstanten Varietäten gesehen. So müssen wir zunächst die Variation der Zellgestalt, der Gestalt und Größe der Sporen und auch die von Lepeschkin beobachtete Mycelbildung als

Mutationen auffassen. Zwischen einer Transformation und einer Mutation ist der große Unterschied, daß erstere allmählich, letztere plötzlich, mit einem Sprunge, entsteht. Beide können zur Bildung neuer Arten oder Rassen führen. Von Beispielen einer Transformation durch die Einwirkung äußerer Faktoren, durch welche eine Varietät entsteht, deren neu-erworbene Eigenschaften konstant vererblich sind, kennt man im ganzen Pflanzenreiche nur äußerst wenige, ja, eigentlich enthalten HANSEN's Untersuchungen über asporogene Varietäten das einzige durchgeführte Experiment in dieser Richtung.

§ 37. Die praktischen Ergebnisse der Untersuchungen über die Variation. Deren Auftreten im Brauereibetriebe.

Bevor wir dieses Kapitel schließen, wollen wir die praktischen Ergebnisse, welche die im vorhergehenden besprochenen Untersuchungen für das Brauwesen haben, und zugleich die Variationen im Betriebe genauer betrachten.

Durch die Verwendung einer asporogenen Varietät einer Betriebshefe in der Brauerei wird man die Sporenanalyse auf wilde Hefe vereinfachen können. Wie man sich erinnern wird (s. S. 30), beruht diese Analyse darauf, daß bei einer gewissen Temperatur die wilde Hefe früher als die Kulturhefe Sporen entwickelt. Falls man nun im Betriebe eine asporogene Hefe verwendet, wird der Umstand, daß man überhaupt sporenbildende *Saccharomyces*-Zellen findet, genügen, um festzustellen, daß eine fremde Hefe zugegen ist. Daß die asporogene Varietät ein ebenso gutes Bier wie die Stammform geben kann, hat HANSEN gezeigt, indem er von *Carlsberg Unterhefe Nr. 2* eine asporogene Varietät nach seinem im vorhergehenden gekennzeichneten Verfahren darstellte und mit ihr ein gutes, normales Bier bekam. Es darf aber nicht vergessen werden, daß die asporogene Varietät in vielen Fällen auf eine merkbare andere Weise im Betriebe arbeiten wird als die ursprüngliche Hefe, aus welcher sie dargestellt wurde.

WILL (1) hat über abnorme Gärungserscheinungen im Betriebe berichtet, welche davon herrührten, daß in der Stellhefe Hautzellen oder deren Abkömmlinge zugegen waren. Auch ALFR. JÖRGENSEN (2) hat ausgesprochen, daß die Hautzellen einen unangenehmen Geschmack geben können. Durch die Darstellung einer sporenlosen Varietät, die ja, wie wir gesehen haben, eine Haut nicht zu bilden vermag, kann man diese Hautbildung vermeiden und damit auch die besagten Betriebsstörungen. Daß eine aus Hautzellen stammende Hefe indessen ganz normales Bier geben kann und im ganzen befriedigend arbeitet, haben RAÝMAN und KRUIS (1) wie auch KLÖCKER dargetan.

Auch die Darstellung von Varietäten mit verstärkter oder verringerter Alkoholbildung hat Bedeutung für die Praxis. HANSEN (7) hat in dieser Hinsicht Versuche angestellt. So hat er durch Züchtung von *Carlsberg Unterhefe Nr. 1* bei 32° C in acht aufeinander folgenden Kulturen ohne Lüftung während der Züchtung eine Varietät bekommen, welche in mit 10 Proz. Saccharose versetzter Würze 1—2 Vol.-Proz. Alkohol weniger als die normale *Carlsberg Unterhefe Nr. 1* hervorbrachte; zugleich gab sie eine bessere Klärung in der Brauerei. Eine Varietät mit verstärkter Alkoholbildung bekam er durch Züchtung derselben Art, *Carlsberg Unterhefe Nr. 1*, auf Würzegelatine während einiger Monate, indem

der Nährboden häufig erneuert wurde. Während eine Vegetation von demselben Ausgangspunkte durch Züchtung in Würze im Laufe desselben Zeitraumes und eine ebenso häufige Erneuerung der Kulturen, zuletzt in mit 25 Proz. Saccharose versetzter Würze. 13 Vol.-Proz. Alkohol erzeugte. 5 gab die durch Züchtung auf Würzegelatine gebildete Varietät in derselben Flüssigkeit dagegen 13.6 Vol.-Proz. Alkohol, also eine größere Menge. Von einer anderen Kulturhefe, *Sacch. cerevisiae*, hat er auch eine Varietät dargestellt, welche mehr Alkohol als die Stammform bildete, und zwar durch Züchtung der Sporen auf Hefenwassergelatine. In diesem 10 Falle bildete die Varietät 3 Vol.-Proz. Alkohol mehr als die entsprechende Vegetation der Stammform, welche die ganze Zeit hindurch in Würze gezüchtet worden war. Nach Hansen handelt es sich in diesen Fällen eher um eine Auswahl der Zellen als um eine Umbildung derselben; es ist jedoch nicht möglich, etwas Sicheres hierüber auszusprechen. Die 15 einzelnen Zellen einer in Würze reingezüchteten Art zeigen ja z. B. einen großen Unterschied in betreff der Gärfähigkeit, selbst wenn sie unter ganz denselben Verhältnissen gezüchtet werden. Dasselbe gilt auch von der Klärungsfähigkeit.

Diejenige Varietät, welche Hansen von *Carlsberg Unterhefe Nr. 1* 20 durch das zur Bildung asporogener Varietäten erwähnte Verfahren darstellte, zeichnete sich durch eine schwächere Attenuation aus und gab ein vollmundigeres Bier als die Stammform; aber sie hatte auch einen Mangel, indem sie zu langsam arbeitete.

Wir haben jetzt einige Beispiele von der praktischen Anwendung 25 im Betriebe der durch eine gewisse Behandlung der Stammform dargestellten Varietäten angeführt. Daß hier ein weites Feld offen liegt, ist einleuchtend, und bedeutungsvolle Resultate werden gewiß durch fortgesetzte Arbeit erreicht werden können. Wir wollen nun noch mit ein paar Worten die Variation im Betriebe besprechen; hier fehlt 30 aber noch ganz und gar die klare, experimentelle Behandlung. Solche Beobachtungen fingen, wie oben erwähnt, gleich mit der Einführung der Reinzuchthefe im Betriebe an. Es würde nutzlos sein, an dieser Stelle in Einzelheiten einzugehen, da alles, was man weiß, auf mehr oder weniger unsicheren Beobachtungen und Diskussionen beruht. Die 35 Leser werden einige Andeutungen auf S. 207 des V. Bandes und Berichte aus der Praxis in den verschiedenen Jahrgängen der „Zeitschrift für das gesamte Brauwesen“ und der „Wochenschrift für Brauerei“ besonders über diejenige Variation der Brauereihefe finden können, welche man das Ausarten, die Degeneration, genannt hat. Ein 40 paar einzelne Mitteilungen über schädliche Variationen sollen hier wiedergegeben werden. Als eine der Ursachen des Degenerierens der Hefe sieht Hayduck (1) die Anreicherung der Hefe mit Stickstoff an; um die Hefe wieder zu regenerieren, empfiehlt er, sie vor dem Anstellen erst in einer Rohrzuckerlösung gären zu lassen. Seyffert (1) fand, 45 daß eine Hefe, welche bisher in der Brauerei eine gute, plötzlich aber eine schlechte Klärung gab, durch Zusatz von Gips zum Brunnenwasser wieder zum normalen Zustande zurückgebracht werden konnte. Auch in Hinsicht auf Geschmack und Geruch können im Betriebe plötzlich unangenehme Aenderungen auftreten. Als Ursache hiervon ist allerlei 50 angesehen worden, z. B. die Züchtung bei abnorm hoher Temperatur, zu starke Lüftung der Würze usw., auch zu langes Kochen der Würze unter Druck im Sterilisator kann nach Will (2) Einfluß auf die Wirksamkeit der Hefe ausüben. Kurz, alle abnormen Verhältnisse im Be-

Temperatur-Tabelle für die Sporenbildung einiger Saccharomyceten in Gipsblockkulturen.

Die ersten deutlichen Ansätze zur Sporenbildung treten bei x °C auf nach Tagen [d], bzw. Stunden [h]:

(Temperaturspalten des Originals: ½°, 1°, 2½°, 3°, 4°, 4½°, 5°, 5½°, 6°, 7°, 7½°, 8°, 8½°, 9°, 9½°, 10°, 10½°, 11°, 11½°, 12°, 12½°, 13°, 13½°, 14°, 15°, 15½°, 16°, 16½°, 17°, 17½°, 18°, 19°, 19½°, 20°, 21°, 21½°, 22°, 22½°, 23°, 23½°, 24°, 24½°, 25°, 25½°, 26°, 26½°, 27°, 27½°, 28°, 28½°, 29°, 29½°, 30°, 30½°, 31°, 31½°, 32°, 32½°, 33°, 33½°, 34°, 35°, 36°, 37°, 37½°, 38°, 39°, 41° C)

Nr.	Spezies	Ansätze zur Sporenbildung (Temperatur: Zeit)	Sporen Größe	Sporen Anzahl im Ascus	Beobachter	Nr.
1	Sacch. cerevisiae I Hansen	8½°: keine; 11½°: 10 d; 23°: 27 h; 25°: 23 h; 30°: 20 h; 33½°: 23 h; 35°: 25 h; 37°: 29 h	2,5-6 μ	[illegible]	[illegible]	[illegible]
2	Sacch. Past. I Hansen	½°: keine; 4°: 14 d; 7°: [illegible]; 10°: 89 h; 15°: 50 h; 18°: 35 h; 23½°: 26 h; 27½°: 24 h; 29°: 27 h; 30°: 30 h; 31½°: keine	1,5-5,0 μ meist 1,5-3,5 μ	[illegible]	[illegible]	[illegible]
3	Sacch. Past. II Hansen	½°: keine; 4°: 17 d; 7°: 7 d; 25°: 25 h; 28°: 34 h; 29°: keine	2-5 μ	[illegible]	[illegible]	[illegible]
4	Sacch. Past. III Hansen	4°: keine; 25°: 28 h; 26½°: 30 h; 28°: 35 h; 29°: keine	2-4 μ	[illegible]	[illegible]	[illegible]
5	Sacch. ellips. I Hansen	4°: keine; 25°: 21 h; 29½°: 23 h; 31°: 36 h; 32½°: keine	2-4 μ	[illegible]	[illegible]	5
6	Sacch. ellips. II Hansen	4°: keine; 8°: 9 d; 25°: 27 h; 29°: 22 h; 31½°: 23 h; 33°: 27 h; 33½°: 31 h; 35°: keine	2-5 μ	[illegible]	[illegible]	[illegible]
7	Sacch. membranaefaciens Hansen	2½°: keine; 7°: 6-7 d; 8½°: 4½-5 d; 25°: 17¼-18 h; 28°: 17¼-18 h; 30°: 17-18 h; 31°: 17-18 h; 32½°: 18 h; 33½°: 19-21 h; 35°: keine			[illegible]	[illegible]
8	Sacch. Ludwigii Hansen	2½°: keine; 7°: 13-14 d; 8½°: 7-9 d; 25°: 20-21 h; 28°: 19-20 h; 30°: 18-19 h; 31°: 18-20 h; 32½°: 19-21 h; 34°: keine	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
9	Sacch. anomalus Hansen	2½°: keine; 7°: 13-14; 25°: 18-20 h; 28°: 17½-19 h; 30°: 17-19 h; 31°: 18-19 h; 32½°: 19-21 h; 34°: keine	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
10	Sacch. Marxianus Hansen	4°: keine; 8°: [illegible]; 22°-25°: Optimum; 32°: Sporen; 34°: keine	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
11	Johannisberg II	3°: keine Sporen; 8°: 8-1[illegible]; 26°: 23-24 h; 33½°: [illegible]; 35°: keine	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
12	Sacch. Hois Grönlund	8°: keine; 9½°: 20 d; 12½°: 10 d; 15½°: 3 d; 25°: 22 h; 28°: 20 h; 32°: 18 h; 34°: 20 h	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
13	Sacch. Aquifolii Grönlund	8½°: keine; 10°: 15 d; 12°: 8 d; 16°: 3½ d; 18°: 48 h; 21°: 44 h; 22½°: 31 h; 26°: 29 h; 27°: 28 h; 28°: 29 h; 31°: keine	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
14	Will's Hefe Nr. [illegible]	5°: keine; 8½°: 9 d; 10°: 6 d; 12°: 4½ d; 15½°: 41 h; 17°: 38½ h; 22°: 20 h; 23°: 17 h; 25°: 14½ h; 31°: 11½ h; 34°: 11 h; 35°: 12 h; 37°: 15 h; 39°: 23 h	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
15	Will's biertrub. Hefe	1°: keine; 3°: 2 d; 5°: 21 d; 24°: 29 h; 25°: 31 h; 27°: 35 [illegible]; 31°: 48 h; 32°: keine	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
16	Will's untergärige Bierhefe Stamm 2 (der Münchner Versuchsstation)	7°: keine; 11°: 9½ d; 13°: 123 h; 14°: 113 h; 15°: 83 h; 17°: 69 h; 18°: 63 h; 19°: 49 h; 21°: 39 h; 22°: 36 h; 23°: 34 h; 25°: 31 h; 28°: 32 h; 30°: 44 h; 31°: 47 h; 34°: keine	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
17	Desgl. Stamm [illegible]	7°: keine; 11°: 11 d; 13½°: 5 d; 15°: 82 h; 16°: 73 h; 17°: 62 h; 18°: 58 h; 20°: 50 h; 21°: 46 h; 22°: 42 h; 23°: 39 h; 25°: 36 h; 26°: 35 h; 28°: 33½ h; 30°: 45 h; 31°: 51 h; 34°: keine	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
18	Desgl. Stamm 7	13°: 5½ d; 14°: [illegible] h; 15°: [illegible] h; 18°: [illegible] h; 20°: [illegible] h; 22°: [illegible] h; 25°: 32 h; 26°: 31½ h; 28°: 32 h; 30°: 50 h; 31°: keine	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
19	Desgl. Stamm 9	7°: keine; 10°: 16½ [illegible]; 23°: 36½ h; 25°: 34 h; 28°: 31 h; 30°: 48 h; 31°: keine	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
20	Sacch. Saturnus Klöcker	4°: keine; 7°: Sporen; 25°: 43 h; 28°: Sporen; 31½°: keine	[illegible]	[illegible]	[illegible]	20
21	Saccharomycopsis capsularis Schiönning	5°: keine; 8°: Sporen; 25°-28½°: Optimum; 34°: Sporen; 35°: keine	[illegible]	[illegible]	[illegible]	21



triebe können auf die Hefe einwirken. Auch die Versuche mit chemischen Reizmitteln (vergl. Bd. I, S. 344) von BIERNACKI, EFFRONT, HAYDUCK, HEINZELMANN und SCHULZ gehören hierher. Außer HANSEN haben besonders DELBRÜCK, ALFR. JÖRGENSEN, KUKLA und WILL Beobachtungen über die Variation der Brauereihefe im Betriebe mitgeteilt. 5

Sicher ist es, daß diejenigen Variationen, welche im Betriebe selbst unter Einwirkung der daselbst obwaltenden Faktoren zum Vorschein kommen, nur flüchtig sind, was auch daraus hervorgeht, daß das Reinzuchtsystem festen Fuß nicht nur in den Brauereien der ganzen Welt gefaßt hat, sondern sich täglich mehr und mehr auch in allen übrigen 10 Alkoholgärungsgewerben verbreitet. Einige Kulturhefen sind besonders konstant, andere sind mehr zur Variation geneigt. Zu den ersteren gehört *Carlsberg Unterhefe Nr. 1*. In der Brauerei Neu-Carlsberg hatte man z. B. in dem Gärungszylinder des Reinzuchtapparats eine Reinkultur dieser Spezies, welche vor mehr als 5 Jahren eingeführt worden war. 15 Schwankungen traten selbstverständlich ein, feste Aenderungen aber nicht. Von verschiedenen Verfassern liegen auch Mitteilungen über eine besondere Konstanz bei Kulturhefen vor. Beachtenswert in dieser Beziehung sind die von IRMISCH, ALFR. JÖRGENSEN und P. LINDNER angestellten Untersuchungen. 20

Die Anwendung des Reinzuchtsystems in der Praxis besteht, wie wir gesehen haben, nicht nur in der Herstellung von Reinkulturen einer bestimmten Art oder Rasse, sondern zugleich in einer Auswahl unter den von den Individuen erzeugten Vegetationen. So wird mit der Einführung der Reinkultur in die Brauerei zugleich eine Rassen- 25 verbesserung angestrebt. Es wird nicht nur gefordert, daß die Art oder Rasse alle für den Praktiker besonders wertvollen Eigenschaften behalten soll, sondern man trachtet zugleich, solche Individuen auszuwählen, welche in einer für die betreffende Brauerei günstigen Richtung variieren, d. h. in hohem Grade im Besitze der guten Eigenschaften sind, 30 und welche die nicht gewünschten Eigenschaften aufgegeben haben. Allein auch in den glücklichsten Fällen vermag man selbstverständlich dies nur zum Teil zu erreichen. Die Rassenverbesserung ist also in diesem Falle eine wiederholte Auswahl der besten Individuen. Aus den Mitteilungen, welche von HANSEN und anderen Forschern über Versuche 35 in dieser Richtung herrühren, ist ersichtlich, daß es hier nicht möglich ist, bestimmte Regeln aufzustellen. Man muß Versuche anstellen. Oft wird man getäuscht werden und das Resultat nicht nach Wunsch ausfallen sehen; man steht eben hier vor etwas, das nicht zu beherrschen ist. Es handelt sich um etwas ganz anderes als um die bloße Darstellung 40 der oben erwähnten asporogenen Rassen und derjenigen, welche sich daran schließen; in letzterem Falle kennt man genau die Bedingungen und kann die Umbildung beherrschen. Endlich muß man sich daran erinnern, daß man, wenn das Material für solche Rassenverbesserungsversuche dem Inhalte der Gärbottiche in der Brauerei selbst entnommen 45 wird, keine Sicherheit hat, daß die entnommene Rasse in genetischer Verbindung mit der früher in den Gärbottich eingesäten steht. Darum, weil beide in den botanischen Charakteren übereinstimmen, brauchen sie nicht auch Abkömmlinge ein und desselben Ahnen zu sein.

Auch von den Weingärungstechnikern liegen ähnliche Mitteilungen 50 über Rassenverbesserung vor, aber auch hier findet man keine Angaben bestimmter Methoden. In mehreren dieser Mitteilungen aus der Praxis fehlt zudem die Kennzeichnung der Arten, von welchen ausgegangen wurde.

Literatur

zum Kapitel Variabilität der Saccharomyceten.

*Beijerinck, M. W., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1897, Bd. 3, S. 449; 1898, Bd. 4, S. 657. *Dubourg, E., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1899, Bd. 128, S. 440. *Hansen, E. Chr., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1883, Bd. 2, S. 41. — (2) Ebenda, 1886, Bd. 2, S. 119. — (3) Ebenda, 1886, Bd. 2, S. 130. — (4) Ebenda, 1888, Bd. 2, S. 189. — (5) Centralbl. f. Bakt., 1889, Bd. 5, S. 664. — (6) Medd. fra Carlsb. Laborat., 1892, Bd. 3, S. 200, und Unters. aus d. Praxis d. Gärungsind., 1895, Heft 1, S. 79. — (7) Annals of Botany, 1895, Bd. 9, S. 549. — (8) Comptes rendus de Carlsberg, 1900, Bd. 5, S. 1. — (9) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1905, Bd. 15, S. 353. *Hayduck, M., (1) W. f. Brauerei, 1884, Bd. 1, S. 697. *Henneberg, W., (1) W. f. Brauerei, 1900, Bd. 17, S. 633. *Jörgensen, Alfr., (1) Die Mikroorg. d. Gärungsindustrie, 1898, S. 276. — (2) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1898, Bd. 21, S. 113. *Klöcker, Alb., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1895, Bd. 4, S. 22. — (2) Ebenda, 1900, Bd. 5, S. 58. *Lepeschkin, W. W., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1903, Bd. 10, S. 145. *Lindner, P., (1) W. f. Brauerei, 1901, Bd. 18, S. 130. — (2) Mikroskop. Betriebskontrolle etc., 3. Aufl, 1901, S. 327. *Rayman, B., und Kruis, K., (1) Mitt. d. Versuchsstat. f. Spiritusind. zu Prag, 1891, Bd. 1. *Seyffert, H., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1896, Bd. 19, S. 318. *Warschawsky, J., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 12, S. 400. *Will, H., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1895, Bd. 18, S. 249. — (2) Ebenda, 1897, Bd. 20, S. 59.

(Manuskript-Einlauf: 8. Jan. 1906.)

9. Kapitel.

Systematik der Familien der Saccharomycetaceen und der Schizosaccharomycetaceen.

§ 38. Einleitung. Gliederung der Familie der Saccharomycetaceen.

Die Pilze, deren Systematik in dem vorliegenden Kapitel dargelegt werden soll, umfassen zwei Familien: die der *Saccharomycetaceae* und die der *Schizosaccharomycetaceae*. Die Arten dieser zweiten Familie wurden 5 früher zu den Saccharomycetaceen gerechnet, mit ihnen also zu einer einzigen Familie vereinigt. Nach den von E. Chr. Hansen (9) im Jahre 1904 aufgestellten Grundsätzen für die Systematik der Saccharomycetaceen bilden die Schizosaccharomycetaceen aber eine Familie für sich und sind darum hier auch abgesondert, und zwar im § 42, be-10 handelt.

Wie schon auf S. 209 des I. Bandes gesagt worden ist, gehören die *Saccharomycetaceae*, denen im nachfolgenden die §§ 38—41 gewidmet sind, zu der Ordnung der *Ascomycetes*, deren niederste Familie sie sind. Die Stellung der *Schizosaccharomycetaceae* im botanischen System hingegen 15 läßt sich heute noch nicht mit Sicherheit angeben; es scheint, als ob sie ein Zwischenglied zwischen den Ascomyceten und den Schizomyceten seien. Aus praktischen Gründen aber werden sie in diesem Kapitel den Saccharomycetaceen an die Seite gestellt.

Bevor wir im folgenden zur systematischen Beschreibung der zu 20 den genannten zwei Familien gehörigen Arten übergehen, wollen wir einen Blick auf die früheren systematischen Arbeiten werfen und danach Rechenschaft von denjenigen Prinzipien ablegen, welche bei der vorliegenden Bearbeitung benutzt worden sind.

Größere Verwirrung als diejenige, welche in der Systematik der Saccharomyceten geherrscht hat, wird man kaum anderswo in der Botanik finden. Die Ursache ist zunächst darin zu suchen, daß so viele Nicht-Botaniker sich mit Arbeiten auf dem Gebiete der Gärungsorganismen beschäftigt haben. 5

Der erste, welcher für die Gattung *Saccharomyces* das Kennmerkmal der Endosporenbildung aufstellte, war Reess (vergl. S. 1). Er beschreibt im ganzen sieben Arten von dieser Gattung, und zwar: *Sacch. cerevisiae* Meyen (s. S. 5), *Sacch. ellipsoideus* Reess (s. S. 6), *Sacch. conglomeratus* Reess, *Sacch. exiguus* Reess, *Sacch. Pastorianus* Reess (s. S. 7), *Sacch.* 10 *mycoderma* Reess und *Sacch. apiculatus* Reess. Von diesen kann nur eine einzige mit Bestimmtheit wiedererkannt werden, nämlich *Sacch. apiculatus*. Reess ist hier nicht konsequent: denn diese Art bildet nicht Endosporen, worauf er übrigens selbst aufmerksam macht, und er sollte sie deshalb nicht zu den Saccharomyceten gerechnet haben, da er ausdrücklich als 15 Charakter für seine Gattung *Saccharomyces* die Endosporenbildung angibt. Er sagt über diesen, im 15. Kapitel zu beschreibenden Sproßpilz: „Sprossungszellen citronenförmig, an beiden Polen mit kurzen Spitzchen versehen, 2—3 μ durchschnittlich breit, 6—8 μ lang; unter Umständen sich kurzfadenartig streckend. Neue Sprossungen bilden sich nur an den 20 Spitzchen der Mutterzellen und lösen sich meist sogleich ab; selten bleiben sie zu kaum verzweigten, wenigzelligen Sproßverbänden vereinigt. Ascosporenbildung nicht sichergestellt, darum auch die Zugehörigkeit zu *Saccharomyces* noch fraglich".

In betreff des *Sacch. mycoderma* hat Reess wahrscheinlich seine Be- 25 schreibung auf eine Mischung von *Mycoderma cerevisiae* oder *M. vini* und einer zur Gattung *Pichia* gehörenden Art gestützt, denn er sagt ausdrücklich, daß die Art Sporen bildet, was ja, wie bekannt, die (im 14. Kapitel zu betrachtenden) *Mycoderma*-Arten nicht tun. Was übrigens die fünf übrigen Reess'schen Arten betrifft, so hat er, wie schon im § 2 30 des 1. Kapitels bemerkt worden ist, deren Charaktere so gut wie ausschließlich nur der Zellgestalt entnommen, wodurch ihre Identifizierung unmöglich geworden ist.

Die meisten Forscher der nächstfolgenden Zeit halten sich an Reess. Eine Ausnahme macht C. O. Harz. Er verwirft alle Reess'schen Arten 35 mit Ausnahme von *Sacch. mycoderma*, indem er davon ausgeht, daß sie nur verschiedene, durch veränderte Ernährung bedingte Formen der Bierhefe sind.

Hansen's systematische Untersuchungen sind mit seinen biologischen und physiologischen eng verwebt. Vom Anfange an geht er in streng 40 konsequenter Weise von der Auffassung aus, daß nur diejenigen Hefenpilze, welche Endosporen bilden, Saccharomyceten sind. Diese Auffassung, welche sich im Laufe der Forschung als die richtige erwiesen hat, wurde wohl allgemein angenommen und mit wenigen Ausnahmen befolgt. Es sind besonders die Aerzte, welche 45 altem Schlendrian folgen und alle Hefenpilze *Saccharomyces* nennen, gleichgültig ob sie Sporen bilden oder nicht. Auch unter den übrigen Forschern findet man einige, welche noch demselben Grundsatz folgen. So werden z. B. bei Saccardo (1) noch im Jahre 1889 Saccharomyceten und Nicht-Saccharomyceten untereinander gemischt; dasselbe gilt auch 50 von J. Schroeter in seiner „Kryptogamenflora von Schlesien" aus dem Jahre 1893.

Die von Hansen aufgestellten systematischen Charaktere, welche

wir im folgenden verwenden, wollen wir mit ein paar Worten besprechen. Unter den morphologischen Charakteren räumt er der Zellgestalt nur einen untergeordneten Platz ein, da sie in einem so hohen Grade von äußeren Faktoren beeinflußt wird. Die meisten Arten treten mit einer
5 großen Anzahl verschiedener Zellgestalten auf (s. S. 5 u. ff.). Nur unter ganz bestimmten Züchtungsbedingungen kann die Zellgestalt als Artencharakter benutzt werden. Leider finden sich noch Botaniker, welche alle großen runden Zellen *Sacch. cerevisiae*, alle kleinen ovalen *Sacch. ellipsoideus* und alle länglichen *Sacch. Pastorianus* nennen; sie stehen
10 also noch immer auf dem alten Reess'schen Standpunkte. Wichtig als Gattungscharakter und in einigen Fällen als Artencharakter ist die Gestalt der Sporen; dasselbe gilt auch von den Hautbildungen. Von großer Bedeutung für die Systematik sind die physiologischen Charaktere. In erster Linie sind hier die Temperatur-Kardinal-
15 punkte für Sprossung, Hautbildung und Sporenbildung (vergl. dazu die Tabelle bei S. 32) nebst dem Verhalten der Arten zu den Zuckerarten (s. 18. u. 19. Kap.) zu nennen. Zur Bestimmung des letzteren sind große Hefenmengen und reine Zuckerarten zu verwenden. Es wird hier eine makrochemische Untersuchung gefordert;
20 eine mikrochemische gibt nicht die genügende Sicherheit. Die zu untersuchende Hefenart säet man in ein mit 5—15 Proz. der betreffenden Zuckerart versetztes Hefenwasser ein und untersucht, ob sich Alkohol gebildet hat. Endlich hat Hansen auch das makroskopische Aussehen der Vegetationen auf verschiedenen festen Nährböden
25 als Unterscheidungsmerkmal herangezogen. Alle diese von ihm benutzten Merkmale sind also im Gegensatze zu denjenigen von Reess experimenteller Natur. Schon hieraus folgt, daß den Ergebnissen der Versuche nur dann ein Wert für die Vergleichung zukommt, wenn jene in der gleichen Weise ausgeführt worden sind.

30 Von Lindner wird das Aussehen der Riesenkolonien (s. S. 23) als Artenmerkmal verwendet; auch Will hat sich um das Studium dieser Gebilde verdient gemacht.

Der Charakter als Oberhefe oder Unterhefe hat jetzt nicht mehr die gleich große systematische Bedeutung für die Artenbeschreibung
35 wie früher, nachdem die neuen Untersuchungen Hansen's auf diesem Gebiete bekannt geworden sind (vergl. S. 163).

Selbst viele von den in den letzten Jahren als neu aufgestellten Arten sind so unvollständig beschrieben, daß sie nicht in eine systematische Uebersicht wie die vorliegende aufgenommen werden können.
40 Der Grund liegt in vielen Fällen darin, daß neuentdeckte Arten die Beschreibungen älterer Arten als unzulänglich erwiesen haben. Als Beispiel sei hier der von P. Lindner aufgestellte *Sacch. hyalosporus* genannt, welcher durch die Bildung von „Perlsporen" charakterisiert wird. Es finden sich aber mehrere Arten, welche im Besitze dieses Charakters
45 sind, und es wird deswegen eine eingehendere Beschreibung, als sie bisher vorliegt, gefordert werden müssen, um jene Art identifizieren zu können. Von verschiedenen Forschern sind auch Namen ohne Beschreibungen gegeben; auf solche wird in der gegenwärtigen Arbeit nicht Rücksicht genommen werden können. Auch werden nur solche
50 Arten in Betracht gezogen werden, von welchen der betreffende Verfasser eine so ausführliche Beschreibung gegeben hat, daß sie zur Identifizierung als hinlänglich angesehen werden kann. Wo nichts anderes angeführt ist, rührt die Artenbeschreibung von demjenigen Ver-

fasser her, welcher die Art aufgestellt hat. Die Literatur über die betreffende Art ist in die Beschreibung aufgenommen.

Zum rechten Verständnis der im nachfolgenden zu gebenden Uebersicht über die Gliederung der Familie der *Saccharomycetaceae* in Gattungen gemäß den von HANSEN (9) im Jahre 1904 aufgestellten Grundsätzen seien zuvor noch einige erklärende Vorbemerkungen vorausgeschickt. Als HANSEN seine Studien auf dem Gebiete der hier in Rede stehenden Pilze begann, war nicht mehr als bloß die Gattung *Saccharomyces* als solche festgelegt. Die Arten-Aufstellung war, wie zuvor bemerkt, unzuverlässig, und es war erst HANSEN, welcher diesen Untersuchungen eine experimentelle Grundlage gab. Eine Vergleichung der im Laufe der Jahre entdeckten Arten untereinander zeigte dann, daß es geraten und angängig sei, die bisherige Gattung *Saccharomyces* zu einer Familie (*Saccharomycetaceae*) auszuweiten, welche er in 8 Gattungen zerlegte. Von zweien von diesen, nämlich *Monospora* und *Nematospora*, ist die Zugehörigkeit zur Familie der Saccharomycetaceen zweifelhaft; sie sind im Anhang zum § 41 kurz beschrieben. Die übrigen sechs Gattungen, welche also, im Gegensatze zu letzteren zweien, als echte Saccharomycetaceen gelten, lassen sich zu zwei Hauptgruppen sondern.

Die erste Hauptgruppe unterscheidet sich von der zweiten dadurch, daß in Nährlösungen sich aus der Aussaat in jedem Falle zunächst und ausschließlich Bodensatzhefe bildet und daß es erst viel später zur Hautbildung kommt, sofern solche überhaupt eintritt. Die Haut ist mehr oder minder stark schleimig; nur die von *Saccharomycopsis capsularis* gebildete macht eine Ausnahme, indem sie der von *Oidium* ähnlich ist. Selbst bei jenen Arten, von denen es bisher heißt, daß ihnen Hautbildung fehle, wird man wahrscheinlich bei genauerer Beobachtung das Auftreten einzelner Hefeninseln (s. S. 13) bemerken. Die Endosporen der Arten dieser ersten Hauptgruppe sind kuglig oder eiförmig oder nierenförmig, glatt, mit einer oder mit zwei Membranen. Die Keimung der Sporen geschieht entweder durch Sprossung oder durch Keimschlauchbildung (Promycel). Die große Mehrzahl der Arten vermag Alkoholgärung hervorzurufen. Diese Gruppe gliedert sich nach HANSEN's Aufstellung in vier Gattungen. Die eine von ihnen ist die neu umgrenzte Gattung *Saccharomyces*, welche im § 39 behandelt ist. Die übrigen drei führen die Namen *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes* und *Saccharomycopsis* und sind im § 40 beschrieben. Es sei dazu nur bemerkt, daß die neue Gattung *Saccharomycodes* für die bis dahin unter dem Namen *Saccharomyces Ludwigii* geführte und eine ihr ähnliche, Art, welche BEHRENS beschrieben hat, geschaffen worden ist. Ueber die Gattungen *Zygosaccharomyces* und *Saccharomycopsis* ist schon auf S. 34 und S. 37—38 je eine vorbereitende Bemerkung gemacht worden. Die Gattung *Saccharomyces* HANSEN in ihrer neuen Begrenzung nun umfaßt eine große Anzahl von Arten. Diese kann man auf Grund ihres Gärverhaltens zu den Zuckerarten zu sechs Untergruppen sondern. Dem § 39 ist dann als Anhang ein Hinweis auf die bisher noch nicht genügend gekennzeichneten Gattungen *Hansenia* und *Torulaspora* angefügt. Auch die Arten-Bezeichnung innerhalb der neu umgrenzten Gattung *Saccharomyces* hat einige beachtenswerte Aenderungen erfahren, durch welche eine Anzahl von Namen, welche bisher in der Mykologie gang und gäbe waren und auch in fast allen übrigen Kapiteln dieses Handbuches im Gebrauch sind, neuen Namen haben Platz machen müssen. So z. B. heißt in diesem neuen System der bisherige *Sacch. cerevisiae I*

Hansen nun kurzweg *Sacch. cerevisiae*, der *Sacch. Pastorianus I* nun *Sacch. Pastorianus*, der *Sacch. Pastorianus III* nun *Sacch. validus* u. dergl. mehr. Näheres über diese Synonymik ist an der Spitze der Beschreibung der einzelnen Arten angegeben.

Die zweite Hauptgruppe der echten Saccharomycetaceen besteht aus den Gattungen *Pichia* und *Willia* und ist dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in Nährlösung alsbald nach geschehener Aussaat auf der Oberfläche eine Kahmhaut bilden. Hansen hatte früher je einen Vertreter dieser nun neu aufgestellten Gattungen entdeckt und damals mit den Namen *Saccharomyces membranaefaciens* bzw. *Sacch. anomalus* belegt. Später wurden dann durch andere Forscher ähnliche Arten aufgefunden und beschrieben, und zwar insbesondere durch Pichi solche, welche dem *Sacch. membranaefaciens* an die Seite zu stellen sind, und durch Will und seine Schüler solche von dem Typus des *Sacch. anomalus*. Diesen Forschern zu Ehren stellte also Hansen die neuen Gattungen *Pichia* und *Willia* für die eben genannten zwei kahmhautbildenden Arten der Familie der *Saccharomycetaceae* auf.

Zum Schlusse dieser Einleitung folgt nun eine

Analytische Uebersicht der Gattungen der Familie der Saccharomycetaceae:

Die Charaktere der Familie der *Saccharomycetaceae* sind die folgenden: Einzellige Sproßpilze mit Endosporenbildung. Typisches Mycel tritt nur bei wenigen Arten auf, reichliche Hefenzellbildung ist jedoch bei allen vorhanden. Jede Zelle kann als Sporenmutterzelle tätig sein. Die Sporen sind einzellig. Die Anzahl der Sporen beträgt gewöhnlich in einer Mutterzelle (Ascus) 1—4, selten bis 12.

1. Sporen oval, rund, hut- oder citronenförmig, mit oder ohne Leiste: siehe 2.
   Sporen nadel- oder spindelförmig: siehe 7.
2. Die Zellen bilden sofort in zuckerhaltigen Nährflüssigkeiten Bodensatzhefe und erst weit später eine Haut (falls eine solche überhaupt gebildet wird): siehe 3.
   Die Zellen bilden sofort eine Haut (Kahmhaut) an der Oberfläche zuckerhaltiger Nährflüssigkeiten; die Haut besitzt durch eingeschlossene Luftblasen ein trockenes Aussehen: siehe 6.
3. Spore mit 1 Membran: siehe 4.
   Spore mit 2 Membranen: . . . . *Saccharomycopsis*
4. Die Zellen fusionieren: . . . . *Zygosaccharomyces*
   Die Zellen fusionieren nicht: siehe 5.
5. Die Sporen keimen mittelst gewöhnlicher Sprossung: . . . . *Saccharomyces.*
   Bei der Keimung der Sporen entwickelt sich ein Promycelium, von welchem aus die Sprossung mit unvollständiger Abschnürung stattfindet: . . . . *Saccharomycodes.*
6. Sporen rund oder halbkugelförmig oder unregelmäßig und eckig. Keine Gärung: . . . . *Pichia.*
   Sporen hut- oder citronenförmig mit vorspringender Leiste: . . . . *Willia.*
7. Sporen nadelförmig. Parasit in Flohkrebsen: . . . . *Monospora.*
   Sporen spindelförmig, fast fadenförmig, mit einer langen Geißel. Parasit in Haselnüssen: . . . . *Nematospora.*

§ 39. Die Gattung Saccharomyces nebst den Gattungen Hansenia und Torulaspora.

Die Zellen der Arten der Gattung *Saccharomyces* (E. Chr. Hansen) bilden mit einer Membran versehene Sporen, welche durch Keimung sprossen. Außer Hefenzellbildung tritt bei einigen Arten auch noch ein Mycel mit scharfen Querwänden auf.

Die **erste Untergruppe** dieser Gattung umfaßt jene Arten, welche

Dextrose, Saccharose und Maltose, aber nicht Lactose vergären können. Zu ihr zählen die folgenden Arten:

Saccharomyces cerevisiae E. Chr. Hansen. Synonyma: *Sacch. cerevisiae I* E. Chr. Hansen (1, 2, 3 u. 8) = *Sacch. cerevisiae* E. Chr. Hansen (9) = *Sacch. cerevisiae* (partim) Meyen (1) = *Torula cerevisiae* (partim) Turpin (1) = *Cryptococcus fermentum* (partim) Kützing (1) = *Crypt. cerevisiae* (partim) Kützing (2) = *Hormiscium cerevisiae* (partim) Bail (1) = *Sacch. cerevisiae* (partim) Reess (1). Von dieser Art finden sich Abbildungen bei Hansen (1, 2, 5 u. 8) sowie in Figur 4 auf S. 6, in Figur 24 auf S. 31 und in Figur 31 und 32 auf S. 35. Die Zellen der Bodensatzhefe sind in der Regel groß und rund. In den Hautvegetationen bei 6—15° C sind sie größtenteils von derselben Gestalt wie in der Bodensatzhefe, nur mit einzelnen abweichenden Formen. Die Temperaturgrenzen für die Sprossung in Würze sind 40° C und 1—3° C. Die Größe der Sporen schwankt von 2,5—6 μ. Gewöhnlich finden sich 1—4, selten 5, in einer Zelle. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 37—37,5° C und 9—11° C; das Optimum liegt bei 30° C. Die Temperaturgrenzen für die Hautbildung auf Würze sind 33—34° C und 6—7° C. Die Art tritt gewöhnlich als eine kräftige Bieroberhefe auf. Sie wurde aus der Betriebshefe einer Brauerei in Edinburgh durch Hansen (1) abgeschieden. Später fand Hansen sie auch in einer Londoner Brauerei. Sie ist eine der vielen Formen, welche von früheren Forschern unter dem Namen *Sacch. cerevisiae* zusammengefaßt worden sind.

Nur ein kleiner Teil der in der Brauindustrie verwendeten Rassen und Arten ist in der Literatur beschrieben worden, jedoch ohne systematische Namen: meist werden sie nur mit dem Namen des Ortes oder des Besitzers der Brauerei belegt, aus der sie stammen, oder gar nur mit der Nummer, unter welcher sie in der Sammlung (dem lebenden Herbar) des betreffenden Forschers geführt werden. Wir nennen beispielsweise die folgenden sechs:

Carlsberg Unterhefe Nr. 1 E. Chr. Hansen. In Figur 7 auf S. 9 und in Figur 8 auf S. 11 sind Hansen's (6) Abbildungen wiedergegeben. Die Zellen sind gewöhnlich oval oder spitz eiförmig. Die Sporen werden äußerst schwierig gebildet; selbst nach langer Zeit (5—6 Tagen bei 25° C) findet man sie nur ganz vereinzelt. Sie gibt im Betriebe (s. S. 10) eine weniger gute Klärung und eine starke Attenuation, liefert aber dafür ein ausgezeichnetes, haltbares Bier; vergl. darüber Bd. V, S. 81 u. 145.

Carlsberg Unterhefe Nr. 2 E. Chr. Hansen. Die Zellen, welche schon in Figur 9 auf S. 11 nach Hansen abgebildet worden sind, haben regelmäßigere Gestalt als die der vorhergehenden Art. Sie bildet auch etwas leichter Sporen. Das mit dieser Hefe hergestellte Bier ist nicht so haltbar; sie klärt aber im Betriebe besser (s. Bd. V, S. 81).

Stamm 2 H. Will (2). Abbildung von dieser Art ist nach Will in Figur 17 auf S. 18 zu finden. Die Zellen sind rund oder oval. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 31° C und 11° C; das Optimum liegt bei 25—26° C. Die Temperaturgrenzen für die Hautbildung auf Würze sind 28—31° C und 7—10° C. Diese Art ist eine hoch vergärende Unterhefe.

Stamm 6 H. Will (2). Die Zellen sind rund oder oval. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 31° C und 11° C. Das Optimum liegt bei 28° C. Die Temperaturgrenzen für

die Hautbildung auf Würze liegen bei 25—31° C und 7—10° C. Diese Art ist eine Unterhefe mit mittelstarker Vergärung.

Stamm 7 H. WILL (2). Die Zellen sind rund oder oval; Riesenzellen kommen regelmäßig vor. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 30° C und 13° C; das Optimum liegt bei 25—26° C. Die Temperaturgrenzen für die Hautbildung auf Würze sind 25—28° C und 4—7° C. Diese Art ist eine niedrig vergärende Unterhefe.

Stamm 93 H. WILL (2) ist in Figur 15 und 16 auf S. 17 nach WILL abgebildet. Die Zellen sind rund oder oval. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 30° C und 10° C; das Optimum liegt bei 28° C. Die Temperaturgrenzen für die Hautbildung auf Würze sind 30—31° C und 4—7° C. Diese Art ist eine hoch vergärende Unterhefe.

Wenngleich in botanisch-systematischer Hinsicht nicht ausreichend beschrieben, dürfen dennoch drei Bierhefen hier nicht unerwähnt bleiben, welche sowohl in den Diskussionen der Gärungstechniker als auch in vielen Abhandlungen der Gärungsphysiologen eine Rolle spielen und in diesem Handbuche an mehreren Stellen genannt sind, nämlich Hefe *Saaz*, Hefe *Frohberg* und Hefe *Logos*. Die erstgenannten zwei wurden in dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin von LINDNER (4) abgeschieden und zwar aus der Bierhefe des „Bürgerlichen Brauhauses" in Saaz in Böhmen, bzw. der Frohberg'schen Brauerei in Grimma in Sachsen und von DELBRÜCK (1), IRMISCH (1), LINDNER (4), REINKE (1) u. a. genauer untersucht. Bilder von Riesenkolonien dieser beiden Hefen finden sich auf Tafel I. Die Hefe *Logos* wurde von H. VAN LAER und DENAMUR (1) aus der Betriebshefe der Brauerei Logos & Co. in Rio de Janeiro in Brasilien isoliert. Ihr Ursprung ist unbekannt; wahrscheinlich rührt sie vom Zuckerrohr her. Die auf S. 149 des V. Bandes gemachte kurze Angabe betreffend die Höhe des durch diese Hefen (in Würze u. dergl.) zu erzielenden Vergärungsgrades muß hier durch die Bemerkung ergänzt werden, daß A. BAU (1) vorgeschlagen hat, den alten Sammelbegriff *Sacch. cerevisiae* nach chemisch-physiologischen Gesichtspunkten in vier Typen zu zerlegen: Sacch. cerevisiae Frohberg obergärig, Sacch. cerevisiae Saaz obergärig, Sacch. cerevisiae Saaz untergärig, Sacch. cerevisiae Frohberg untergärig. Während also die Namen *Saaz* und *Frohberg* ursprünglich zur Bezeichnung zweier bestimmter Hefenarten dienten, werden sie hier als Typus-Namen benutzt. Verschiedene andere Brauerei-Oberhefen sind von H. VAN LAER, ALFR. JÖRGENSEN, GREG u. a. beschrieben worden; vergl. Bd. V, S. 81—82.

Von anderen bekannten Oberhefen sind die *Rasse II* und die *Rasse XII* für Brennereizwecke und letztere auch für Preßhefe in dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin isoliert worden; vergl. darüber Bd. V, S. 266 und HENNEBERG (1).

Saccharomyces Pastorianus E. CHR. HANSEN. Synonyma: *Sacch. Pastorianus I* E. CHR. HANSEN (1, 2, 3 u. 8) = *Sacch. Pastorianus* E. CHR. HANSEN (9) = *Sacch. Pastorianus* (partim) REESS (1). Diese Art ist bei HANSEN (1 u. 2) und in Figur 6 auf S. 7 abgebildet worden. Die Vegetation in Würze besteht hauptsächlich aus wurstförmigen Zellen; aber auch runde und ovale Zellen finden sich darunter. Die Temperaturgrenzen für die Sprossung in Würze sind 34° C und 0.5° C. Die Größe der Sporen beträgt 1,5—3,5 μ; selten erreichen sie einen Durchmesser von 5 μ. Ihre Anzahl ist am häufigsten 1—4, in sehr langgestreckten Zellen bisweilen auch 5—10. Die Temperaturgrenzen für die Sporen-

bildung auf Gipsblöcken sind 29,5—31,5° C und 0,5—4° C; das Optimum liegt bei 27,5° C. Die Temperaturgrenzen für die Hautbildung auf Würze liegen bei 26—28° C und 3—5° C. Diese Art ist eine Unterhefe und wurde zuerst im Staube der Luft in einer Brauerei in Kopenhagen und später auch in kranken Bieren gefunden. Sie ist eine gefährliche Krankheitshefe in den Brauereien, indem sie im Biere einen unangenehmen Geruch und einen stark bitteren Geschmack hervorzurufen vermag; vergl. Bd. V, S. 202. Sie hat gewöhnlich auch einen nachteiligen Einfluß auf die Klärung. Nach Mach und Portele (1) kann sie dennoch in der Weinbereitung ein gutes Produkt geben. Ihre Riesenkolonie ist auf *Taf. I* abgebildet.

Saccharomyces intermedius E. Chr. Hansen. Synonyma: *Sacch. Pastorianus II* E. Chr. Hansen (1, 2, 3 u. 8) = *Sacch. intermedius* E. Chr. Hansen (9) = *Sacch. Pastorianus* (partim) Reess (1). Diese Art ist bei Hansen (1 u. 2) sowie in Figur 11 auf S. 14 und Figur 14 auf S. 16 abgebildet. Die Zellen sind gewöhnlich etwas größer als diejenigen der vorhergehenden Art und von derselben Gestalt. Die Temperaturgrenzen für die Sprossung in Würze sind 40° C und 0,5° C. Die Sporengröße beträgt 2—5 μ, selten 4—5 μ. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 27—29° C und 0,5—4° C; das Optimum liegt bei 25° C. Die Temperaturgrenzen für die Hautbildung auf Würze sind 26—28° C und 3—5° C. Die Zellen der jungen Haut bei 13—15° C unterscheiden sich von den entsprechenden Zellen der nächst folgenden Art dadurch, daß sie gewöhnlich rund oder oval sind, während bei *Sacch. validus* sich unter diesen Verhältnissen viele wurstförmige Zellen vorfinden. Die Strichkulturen von dieser Art auf Hefenwassergelatine bei 15° C weisen nach 16 Tagen glatte Ränder auf, wodurch sie sich auch von denjenigen des *Sacch. validus* unterscheidet. Diese Art ist eine schwache Oberhefe und wurde in der Luft einer Kopenhagener Brauerei gefunden. Ihre Riesenkolonie ist auf *Taf. I* abgebildet.

Saccharomyces validus E. Chr. Hansen. Synonyma: *Sacch. Pastorianus III* E. Chr. Hansen (1, 2, 3 u. 8) = *Sacch. validus* E. Chr. Hansen (9) = *Sacch. Pastorianus* (partim) Reess (1). Abbildungen der Zellen finden sich bei Hansen (1 u. 2) und in Figur 12 auf S. 14 und Figur 13 auf S. 15. Die Gestalt der Zellen in Würze ist die gleiche wie bei den zwei vorhergehenden Arten. Die Temperaturgrenzen für die Sprossung in Würze sind 39—40° C und 0,5° C. Die Sporen haben 2—4 μ, selten 3,5—4 μ im Durchmesser. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 27—29° C und 4—8,5° C; das Optimum liegt bei 25° C. Die Temperaturgrenzen für die Hautbildung auf Würze liegen bei 26—28° C und 3—5° C. Die Zellen der bei 13—15° C herangewachsenen jungen Haut unterscheiden sich von den entsprechenden Zellen des *Sacch. intermedius* dadurch, daß viele von ihnen sehr lang, wurstförmig, bei der letztgenannten Art hingegen häufig rund oder oval sind. Die Strichkulturen auf Hefenwassergelatine bei 15° C weisen nach 16 Tagen, zum Unterschied von der vorhergehenden Art, deutlich haarige Ränder auf. Diese Art tritt gewöhnlich als Oberhefe auf und ist eine gefährliche Krankheitshefe, die Hefentrübung im Biere hervorruft; s. Bd. V, S. 201. Ein geringer Zusatz dieser Art zur Stellhefe kann aber unter Umständen opalisierendes Bier hell machen, indem sie wahrscheinlich während der Nachgärung diejenigen Stoffe entfernt, welche das Opalisieren hervorrufen; vergl. Bd. V, S. 139. Die Art wurde in hefentrübem unter-

gärigem Kopenhagener Bier gefunden. Man vergleiche auch die Abbildung ihrer Riesenkolonie auf *Taf. I.*

Saccharomyces ellipsoideus E. CHR. HANSEN. Synonyma: *Sacch. ellipsoideus I* E. CHR. HANSEN (1, 2, 3 u. 8) = *Sacch. ellipsoideus* E. CHR. 5 HANSEN (9) = *Sacch. ellipsoideus* (partim) REESS (1). Von dieser Art sind Abbildungen bei HANSEN (1 u. 2) sowie in Figur 5 auf S. 6 und in Figur 10 auf S. 13 zu finden. Die Zellen sind ellipsoidisch, können aber auch wurstförmig sein. Die Temperaturgrenzen für die Sprossung in Würze sind 40—41° C und 0,5° C. Die Sporen sind 2—4 μ, sehr 10 selten 3,5—4 μ groß. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 30,5—32,5° C und 4—7,5° C; das Optimum liegt bei 25° C. Die Temperaturgrenzen für die Hautbildung sind 33—34° C und 6—7° C. Die Zellen der bei 13—15° C herangewachsenen jungen Haut unterscheiden sich von den entsprechenden des *Sacch. turbidans*, 15 welche rund und oval sind, durch ihre vielen langen, wurstförmigen Gestalten. Die Strichkulturen auf Würzegelatine bei 25° C weisen nach 11—14 Tagen eine eigenartige netzförmige Struktur auf (Unterschied von den vorhergehenden Arten und von *Sacch. turbidans*). Die Art ist im allgemeinen eine Unterhefe und wurde an der Oberfläche reifer 20 Trauben in den Vogesen gefunden; sie ist eine der vielen Arten, welche bei der Weingärung tätig sind. Man beachte auch *Taf. I.*

Zahlreiche Trauben- und Obstweinhefen, welche dem *Sacch. ellipsoideus* nahestehen, sind von ADERHOLD, HOTTER, KAYSER, LENDNER, MARX, MÜLLER-THURGAU, NASTJUKOW, OSTERWALDER, SEIFERT, WORT- 25 MANN u. a. isoliert und beschrieben worden; vergl. darüber das 16. Kapitel des V. Bandes. Eine der am besten bekannten Arten ist

Johannisberg II WORTMANN (1), welche bei ADERHOLD (1) und in Figur 27 und 28 auf S. 33 nach HANSEN (7) abgebildet ist. Diese Art zeichnet sich nach ADERHOLD durch ihre außerordentlich reiche Sporen- 30 bildung aus, indem 99—100 Proz. der Zellen auf Gipsblöcken Sporen bilden. Nach HANSEN (8) sind die Temperaturgrenzen für die Sprossung in Würze 37—38° C und 0,5° C; er befand ferner die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken zu 33—34,5° C und 2—3° C. Diese Art ist gewöhnlich untergärig.

35 *Saccharomyces turbidans* E. CHR. HANSEN. Synonyma: *Sacch. ellipsoideus II* E. CHR. HANSEN (1, 2, 3 u. 8) = *Sacch. turbidans* E. CHR. HANSEN (9) = *Sacch. ellipsoideus* (partim) REESS (1). Diese Art ist bei HANSEN (1 u. 2) abgebildet. Die Gestalt ihrer Zellen ist im wesentlichen ähnlich der bei der vorigen Art. Die Temperaturgrenzen für die 40 Sprossung in Würze sind 40° C und 0,5° C. Die Sporen sind 2—5 μ, selten 4—5 μ groß. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 33—35° C und 4—8° C; das Optimum liegt bei 29° C. Die Temperaturgrenzen für die Hautbildung liegen bei 36—38° und 3—5° C. Die Zellen der bei 13—15° C herangewachsenen jungen Haut unter- 45 scheiden sich von den entsprechenden des *Sacch. ellipsoideus* durch ihre hauptsächlich runde und ovale Gestalt. Die Art tritt sowohl als Unterhefe als auch als Oberhefe auf und ist eine gefährliche Krankheitshefe, welche Hefentrübung in den Untergärungsbrauereien hervorruft. Sie wurde zusammen mit *Sacch. validus* in hefentrüben Bieren gefunden; 50 vergl. Bd. V, S. 201.

Saccharomyces Willianus SACCARDO. Synonyma: *Saccharomyces I of Will* BAY (1) = *Sacch. Willianus* SACCARDO (1). Diese Art ist zuerst von WILL (1) beschrieben und abgebildet worden, jedoch ohne Namen

(als „*Hefe Nr. 811*"). Die Zellen sind eiförmig. Die Sporen haben 1,5 bis 5 μ im Durchmesser, meist 3,5 μ. Mehr als vier Sporen sind in einer Zelle nicht beobachtet worden. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 39—41° C und 4—9° C; das Optimum liegt bei 34° C. Die Temperaturgrenzen für die Hautbildung auf Würze 5 sind 39—41° C und 4° C. Die Art ruft unangenehmen Geschmack und Trübung im Biere hervor; vergl. darüber Bd. V, S. 114 u. 202. Ihre Riesenkolonie ist auf *Taf. I* abgebildet.

Saccharomyces Bayanus Saccardo. Synonyma: *Saccharomyces II of Will* Bay (1) — *Sacch. Bayanus* Saccardo (1). Diese Art wurde zuerst 10 von Will (1) beschrieben, jedoch ohne Namen (als „biertrübende Hefe"). Die Zellen sind spitz eiförmig, kreisel- oder spindelförmig, von 7—11 μ Länge und 5—6 μ Breite. In alten Häuten können die Zellen bis 30 μ lang und 2—3 μ breit werden. Die Sporen werden in einer Anzahl von 1—4 gebildet und ihre Größe beträgt 2—4 μ. Die Temperatur- 15 grenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 30—32° C und 0,5 bis 3° C; das Optimum liegt bei 23,5—24° C. Diese Art ruft außer Trübung im Biere einen süßlich metartigen und unangenehm aromatischen Geschmack, nebst ungemein bitterem, herbem und adstringierendem Nachgeschmack hervor. Der Geruch des Bieres wird gleichzeitig charakteri- 20 stisch aromatisch, wie nach fauligem Obst; vergl. Bd. V, S. 202—203.

Saccharomyces Ilicis Grönlund ist bei Grönlund (1) abgebildet. Die Zellen sind meist kugelförmig. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 36—38° C und 8—9,5° C; das Optimum liegt bei 32° C. Die Strichkulturen auf Würzegelatine haben ein mehliges 25 Aussehen. Die Art wurde auf den Früchten von *Ilex Aquifolium* gefunden und ist eine Unterhefe, die in Würze 2,78 Vol.-Proz. Alkohol erzeugt. Die Würze bekommt durch sie einen unangenehm bitteren Geschmack.

Saccharomyces Aquifolii Grönlund (1) bildet Zellen, welche denen von 30 *Sacch. Ilicis* ähnlich sind. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 27,5—31° C und 8—10,5° C; das Optimum liegt bei 27° C. Die Strichkulturen auf Würzegelatine haben ein glänzendes Aussehen. Die Art ist eine Oberhefe und wahrscheinlich eine Kulturhefe. In Würze erzeugt sie 3,71 Vol.-Proz. Alkohol und verleiht der 35 Würze einen süßlichen Geschmack mit bitterem Nachgeschmack. Sie wurde auf den Früchten von *Ilex Aquifolium* gefunden.

Saccharomyces Vordermannii Went et Prinsen Geerligs. Abbildung von dieser Art findet sich bei Went und Prinsen Geerligs (1). Die Zellen sind rundlich, birn- oder zwiebelförmig, bisweilen findet man 40 eckige oder langgestreckte Gestalten. Die Anzahl der Sporen ist gewöhnlich 4. Eine Haut wird nicht gebildet, in alten Kulturen nur ein Hefenring. Die Art soll 9—10 Proz. Alkohol bilden. Sie wurde im „Ragi", der bei der Arrakfabrikation auf Java verwendet wird (s. 13. Kap. d. V. Bds.), gefunden. Sie erzeugt einen sehr feinen, fuselfreien Arrak. 45

Saccharomyces piriformis Marsh. Ward ist bei Marshall Ward (1) und in Figur 31 auf S. 172 des I. Bandes abgebildet. Die Zellen sind im allgemeinen ellipsoidisch oder oval, bisweilen kugelförmig und haben 5—9 μ im Durchmesser. Die Anzahl der Sporen in einer Zelle beträgt gewöhnlich 4. Sie werden auf Gipsblöcken bei 25° C nach 24 Stunden 50 gebildet. In Nährlösungen entsteht im Verlaufe von drei Wochen eine Haut, die aus birnförmigen Zellen aufgebaut ist, zwischen denen auch wurstförmige sich finden. Die Temperaturgrenzen für die Sprossung

sind 35° C und 10° C. Die Art ist eine Unterhefe und wurde in England in Ginger-beer gefunden; s. Bd. V, S. 255 - 256.

Saccharomyces mali Risler Kayser (1) ist bei letztgenanntem Forscher abgebildet. Die Zellen sind kugelförmig und haben 4—6 μ im Durch-
5 messer. Die Bodensatzhefe liegt sehr fest. Diese Art bildet keine Haut. Die Sporen werden bei 15° C nach 96 Stunden gebildet. Die Art ist eine Unterhefe, die in Apfelwein gefunden wurde.

Saccharomyces Saké Yabe (1) wurde von Kozai (1) zuerst beschrieben, jedoch ohne Namensgebung. Die Zellen sind im allgemeinen kugelig,
10 6—12 μ groß. In älteren Kulturen treten Riesenzellen auf. Bei 40 bis 41° C bildet die Art auf Gipsblöcken Sporen nach 36 Stunden, bei 30—32° C nach 14 Stunden und bei 3—4° C nach 15 Tagen. Die Anzahl der Sporen beträgt 1—3, sehr selten mehr, in einer Zelle. Diese Art wurde von Kozai auf Koji gefunden und in reingezüchtetem Zu-
15 stande zur Herstellung von „Saké" mit gutem Erfolge benutzt; vergl. Bd. V, S. 248.

Die **zweite Untergruppe** umfaßt jene Arten, welche wohl Dextrose und Saccharose, aber nicht auch Maltose und Lactose vergären. Zu ihr gehören:

20 *Saccharomyces Marxianus* E. Chr. Hansen (3, 6 u. 8) ist bei Hansen (6) und in Figur 19 auf S. 20 abgebildet. Die Zellen sind klein, oval oder eiförmig, oder langgestreckt-wurstförmig, oft in Kolonien. Wenn die Kulturen einige Zeit in Würze gestanden haben, bilden sich mycelartige Kolonien. Die Temperaturgrenzen für die Sprossung in Würze sind 46
25 bis 47° C und 0,5° C. Wenn die Würzekulturen 2—3 Monate alt sind, findet man auf ihnen eine sehr zarte Haut, welche teils aus kurz wurstförmigen, teils aus ovalen Zellen besteht. Auf festem Nährboden entwickelt die Art ein Mycelium, welches z. B. dem von *Monilia candida* gebildeten ähnlich ist. Die Sporen sind mehr oder minder nierenförmig,
30 bisweilen jedoch rund oder oval, am häufigsten ca. 3—5 μ lang. Zufolge Klöcker (1) sind die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken 32—34° C und 4—8° C; das Optimum liegt bei 22—25° C. Nach Hansen gibt sie nach langem Stehenlassen in Würze nur 1 bis 1,3 Vol.-Proz. Alkohol. In einer Lösung von 15 Proz. Saccharose in
35 Hefenwasser bildete sie bei 25° C nach 18 Tagen 3,75 Vol.-Proz. Alkohol und nach 38 Tagen 7 Vol.-Proz. In Hefenwasser mit 10 und 15 Proz. Dextrose bildete sie nach 1 Monat 6,5 bezw. 8 Vol.-Proz. Alkohol. Die Art wurde von Marx auf Weinbeeren gefunden.

Saccharomyces exiguus E. Chr. Hansen (3). Synonym: *Sacch. exiguus*
40 (partim) Reess (1). Diese Art bildet Zellen, welche denen der vorhergehenden Art ähneln, unterscheidet sich aber dadurch von ihr, daß sie keine mycelähnlichen Kolonien in Würze und kein Mycel auf Gelatine entwickelt. Die Sporenbildung ist sehr spärlich, und selbst nach mehreren Monaten bildet die Art nur die Andeutung einer Haut. Sie brachte bei
45 25° C in einem mit 15 Proz. Saccharose versetzten Hefenwasser bis 6 Vol.-Proz. Alkohol und in einer 15-proz. Dextroselösung nach 14 Tagen 8 Vol.-Proz. Alkohol hervor. Sie wurde ziemlich häufig in der Hefe einer Preßhefenfabrik gefunden.

Saccharomyces Zopfii Artari (1) ist bei letzterem Forscher abgebildet.
50 Die Zellen sind kurz und breit-ellipsoidisch oder kugelförmig und haben 3—6 μ im Durchmesser, ausnahmsweise 8 μ. Wenn die Art in einer mit 5—8 Proz. schwefelsauren Ammoniaks versetzten Dextroselösung (vergl. S. 101) gezüchtet wird, sollen Querwände in den Zellen auftreten.

Das Temperaturmaximum für die Sprossung in Würze ist 33—34° C; das Optimum liegt bei 28—29° C. Die Sporen bilden sich leicht sowohl in flüssigen als auch auf festen Nährböden. Deren Anzahl beträgt gewöhnlich 2 in einer Zelle, bisweilen aber 1 oder 3 oder 4. Sie sind kugelförmig, 1.5—3 μ groß. Das Temperaturmaximum für die Sporenbildung liegt in der Nähe von 32° C; bei 29° C findet man reife Sporen nach 21 Stunden. Die vegetativen Zellen sollen während einer halben Stunde 130° C trockener und 66—67° C feuchter Wärme vertragen. Die Art wurde im Zuckersafte in einer Zuckerfabrik in Sachsen gefunden.

Saccharomyces Bailii P. Lindner (2) ist bei letztgenanntem Forscher abgebildet. Ihre Zellen sind groß, ziemlich derbwandig, von etwas langgestreckter Form. In alten Kulturen treten unregelmäßig gestaltete, amöbenartige Zellen auf. Die Sporen sind stark lichtbrechend. Hautbildung tritt auf Nährlösungen nicht ein, sondern nur ab und zu Hefeninselchen. Die Strichkulturen auf Würzegelatine sind grauweiß, glänzend. Die Riesenkolonien auf dem gleichen Nährboden wachsen langsam heran und sind grauweiß und glänzend. Eine Verflüssigung der Gelatine tritt nicht ein. Die Art wurde aus Danziger Jopenbier isoliert; vergl. S. 119.

Saccharomyces Joergensenii Lasché (1) ist bei letzterem Forscher abgebildet. Deren Zellen sind rund oder oval, 2.5—5.5 μ groß, zu kurzen Ketten verbunden. Die Sporen sind kugelförmig, 1—2,5 μ dick und stark lichtbrechend. Gewöhnlich findet man 2—3 Sporen in einer Zelle, selten 4. Hautbildung ist nicht beobachtet worden, wohl aber eine schwache Hefenringbildung, aus runden und ovalen Zellen bestehend. Nach vorausgegangener Züchtung in Dextrose-Hefenwasser sind die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken 26—30° C und 8—12° C; das Optimum liegt bei 25° C. Diese Art wurde in amerikanischem Temperance-Bier gefunden und erzeugte in Würze (von 10,19 Proz. Balling) 0,89 Gewichts-Proz. Alkohol.

Die **dritte Untergruppe** vereinigt jene Arten, welche Dextrose und Maltose, aber nicht auch Saccharose und Lactose vergären. Es sind dies:

Saccharomyces Rouxi Boutroux (1) ist bei letztgenanntem Forscher abgebildet. Die Zellen sind rund oder oval, zu Ketten vereint, sehr regelmäßig und haben 4—5 μ im Durchmesser. Eine Hautdecke wird nicht gebildet sondern bloß hier und da Hefeninselchen. Die Anzahl der Sporen beträgt 1, 2 oder 3 in einer Zelle; sie werden auch an der Oberfläche der Nährflüssigkeit gebildet. Selbst bei Ueberschuß von Dextrose entstehen nicht mehr als 5.3 Vol.-Proz. Alkohol. Diese Art ist wahrscheinlich dieselbe, welche Roux (1) erwähnt und welche in Dextrose gefunden wurde. Boutroux fand sie in gärenden Fruchtsäften. Trotz der sehr mangelhaften Beschreibung ist die Art hier wegen ihres interessanten Verhaltens zu den Zuckerarten mit aufgenommen worden.

Saccharomyces Soja Saito (2). Diese Art ist noch nicht genauer beschrieben worden, was aber demnächst erfolgt. Sie zeichnet sich dadurch aus, daß Invertase im Innern der Zellen gebildet wird, ohne daß eine Vergärung von Saccharose stattfindet. Auch Raffinose, Inulin und d-Methylglucosid werden nicht angegriffen, wohl aber Lävulose, Galactose und Mannose. Sie wurde in „Moromi“, der zur Herstellung von Soja-Sauce benutzten Maische, gefunden; vergl. darüber das 11. Kapitel.

Zur **vierten Untergruppe,** deren Arten wohl Dextrose, aber nicht

auch Saccharose, Maltose und Lactose zu vergären vermögen, sind die nun zu nennenden zwei Arten zu zählen.

Saccharomyces mali Duclaux Kayser (1) ist bei letztgenanntem Forscher abgebildet. Die Zellen sind 6—12 μ lang und 4—8 μ breit; die Bodensatzhefe liegt sehr lose. Bildet eine Haut. Die Sporen treten nach 84 Stunden bei 15° C auf. Diese Art ist eine Oberhefe und wurde in Apfelwein, dem sie ein gutes Bouquet verleiht, gefunden.

Saccharomyces flava lactis Krueger (1) weist ca. 3,8—4 μ messende Zellen auf, welche klein, ellipsoidisch und zu Ketten aneinander gereiht sind. Die Kolonien auf Gelatine sind gelb; sie verflüssigen schnell die Gelatine und überziehen sie mit einer gelben Haut. Dasselbe ist auch bei der Aussaat auf Milch und auf einer Lösung von Milchzucker der Fall. Der gelbe Farbstoff wird nur bei Zutritt der Luft gebildet. Die Art wurde in Butter gefunden, welchem sie eine abnorm gelbe Farbe verliehen hatte. Der Geruch war höchst unangenehm, an faulen Harn erinnernd. Wegen ihrer merkwürdigen Farbstoffbildung ist die Art hier mit aufgenommen worden, obgleich ihre Beschreibung sehr unvollständig ist; vergl. Bd. II, S. 208 u. 220.

Die Arten der **fünften Untergruppe** sind durch ihr Vermögen ausgezeichnet, Lactose zu vergären. Sie gehören also zu den Erregern alkoholischer Gärung in Milch (s. Bd. II, S. 124 u. f.), die bei der Bereitung von Kefir, Kumys, Mazun u. dergl. eine wichtige Rolle spielen. Diese Untergruppe zählt nur wenige Arten. Grotenfelt (1) nannte einen von ihm in Milch gefundenen Sproßpilz *Sacch. acidi lactici* (nicht *S. lactis acidi*, wie man sehr oft, aber irrtümlich, sieht). Er sagt von dieser Art und einer früher von Duclaux (1) beschriebenen anderen, welche er *Sacch. lactis* nennt, daß sie beide auf Kartoffeln Sporen bilden. Kayser hat später dargetan, daß die Duclaux'sche Art keine Sporen zu bilden vermag und also eine *Torula* ist; es ist also höchst wahrscheinlich, daß auch Grotenfelt's Art kein *Saccharomyces* ist. Eine Menge anderer Sproßpilze sind später unter dem Namen *Saccharomyces* beschrieben worden, sind aber alle als *Torula* anzusehen; vergl. dazu d. 13. Kap. Hingegen sind als echte Saccharomyceten die folgenden anzusehen: In Emmentaler Käse fanden E. von Freudenreich und O. Jensen (1) einen lactosevergärenden *Saccharomyces*; später erwähnt O. Jensen (1) zwei von ihm aus Butter isolierte Arten und Mazé (1) eine Art, welche er in Käse fand. Keine dieser Formen hat einen systematischen Namen erhalten; sie sind sehr unvollständig beschrieben. Die einzige Art, über welche ausführlichere Angaben vorliegen, und die einen systematischen Namen bekommen hat, ist

Saccharomyces fragilis Jörgensen. Diese Art ist bei Jörgensen (1) und in Figur 16 auf S. 125 des II Bandes abgebildet. Die Zellen sind klein, oval und langgestreckt. Die länglich-runden Sporen werden sowohl in gärenden Flüssigkeiten als auch auf Gelatine und in Gipsblockkulturen gebildet; in letzteren erscheinen sie bei 25° C nach 20 Stunden, bei 15° C nach 40 Stunden. In 10-proz. Lactose-Hefenwasser erzeugte die Art bei Zimmertemperatur nach 8 Tagen 1 Gewichts-Proz. Alkohol, nach 4 Monaten 4 Proz. und in Würze (von 11 Proz. Balling) nach 10 Tagen bei Zimmertemperatur ca. 1 Proz. Alkohol. Diese Art wurde aus Kefir abgeschieden.

Die **sechste Untergruppe** der *Saccharomyces*-Arten hat den Mangel der Fähigkeit zur Erregung von Alkoholgärung als Kennmerkmal. Sie weist derzeit nur einen Vertreter auf, das ist

Saccharomyces Hansenii Zopf (1). Dessen Zellen sind kugelig bis ellipsoidisch und haben 4—11 μ im Durchmesser. Jede Zelle ist mit einem oder mehreren Fetttröpfchen versehen. Die Impfstriche auf Würzegelatine bilden glänzend weiße Kolonien. Die Gelatine wird nicht verflüssigt. Die Sporen sind kugelig und messen 2—4 μ; sie treten in der Einzahl oder zu zweien in einer Zelle auf. Die Art bildet Oxalsäure in Lösungen von Dextrose, Galactose, Saccharose, Lactose, Maltose, Dulcit, Glycerin und Mannit. Sie wurde in Baumwollsaatmehl gefunden. Die Stellung der Art ist wegen der kurzen Beschreibung (Kahmhautbildner?) fraglich. —

In engem Anschluß an die Gattung *Saccharomyces* stehen die zwei folgenden Gattungen *Hansenia* und *Torulaspora*.

Bei der Gattung *Hansenia* P. Lindner (5) ist ein großer Teil der Zellen citronenförmig. Im übrigen gelten dieselben Charaktere wie für die Gattung *Saccharomyces* (also auch Sporenbildung). Lindner hat diesen Gattungsnamen für „die *Apiculatus*-Hefen" vorgeschlagen, gibt aber keine anderen Merkmale. Er geht davon aus, daß alle „*Apiculatus*-Hefen" sporenbildend seien. Da aber diejenige Art, welche Reess als *Sacch. apiculatus* benannt hat, keine Sporen bildet, kann die Reess'sche Art nicht zu dieser Gattung gerechnet werden; vorläufig kann nur diejenige Art, welche dem *Sacch. apiculatus* morphologisch ähnlich ist, aber sich von dieser Art durch ihre Sporenbildung unterscheidet, zur Gattung *Hansenia* gezählt werden. Zu dieser Gattung gehörende Arten sind nur wenige Male (von Beijerinck, Lindner, Röhling) aufgefunden, aber noch nicht genauer beschrieben worden.

Bei der Gattung *Torulaspora* P. Lindner (5) sind die Zellen kugelrund, klein, mit einem großen Fetttropfen in jeder Zelle und ähneln den Zellen der *Torula*-Arten. Auch von dieser Gattung hat Lindner die Charaktere noch nicht angegeben, nennt aber als Typus die von ihm (3) früher unter dem Namen *Sacch. Delbrücki* beschriebene und abgebildete *Torulaspora Delbrücki* Lindner (5). Deren Sporen werden in der Anzahl von 1—2 in einer Zelle gebildet. Die Art vergärt Dextrose und Lävulose und wurde in englischem Biere (Ale) gefunden.

Obwohl also nur die Zellgestalt als Gattungsdiagnose für die zwei obenstehenden Gattungen gegeben worden ist, sind sie hier nichtsdestoweniger genannt worden, weil vielleicht später hinlängliche Charaktere gefunden werden mögen. Wie die Sachlage im Augenblicke ist, sind die beiden Gattungen von der Gattung *Saccharomyces* nicht zu unterscheiden, weil die Zellgestalt allein nicht als Gattungscharakter gelten kann.

§ 40. Die Gattungen Zygosaccharomyces, Saccharomycodes und Saccharomycopsis.

Die Gattung *Zygosaccharomyces* Barker (1) stimmt mit der Gattung *Saccharomyces* im allgemeinen überein, unterscheidet sich aber von dieser durch eine der Sporenbildung vorausgehende und in der Bezeichnung zum Ausdruck gebrachte Verschmelzung (Fusion) der Zellen aus.

Zygosaccharomyces Barkeri Saccardo et Sydow (1) wurde zuerst von Barker (1), jedoch ohne systematischen Artnamen, beschrieben und abgebildet. Die Figur 30 auf S. 34 des vorliegenden Bandes veranschaulicht die ovale Gestalt der Zellen. Die Temperaturgrenzen für die Sprossung auf Würzeagar sind 37—38° C und 10—15° C. Diese Art

bildet keine Haut sondern nur einen Hefenring. Die Sporen werden außer auf Gipsblöcken auch auf verschiedenen würzehaltigen festen Nährböden, wie auch auf feuchtem Brot, Kartoffeln, Ingwer usw. gebildet. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 37—38° C und 13° C. Vergoren wird Dextrose, Lävulose und Saccharose, aber nicht Maltose, Lactose und Dextrin. Diese Art wurde in einem Gefäße mit Ingwer in einer mit Saccharose versetzten Mayer'schen Nährlösung gefunden.

Zygosaccharomyces Priorianus Klöcker wurde von Klöcker (2) vorläufig und ohne Namen beschrieben. Die Zellen in jungen Würzekulturen sind von verschiedener Gestalt, rund, oval oder langgestreckt, fest miteinander verbunden, so daß die Bodensatzhefe eine fest zusammenhängende Masse bildet. Die Zellen sind am größten bei 13—16° C, welche Temperatur im ganzen der Entwicklung sehr günstig ist: bei höheren Temperaturen, z. B. oberhalb 27° C, sind viele der Zellen sehr klein. Bei niedrigen Temperaturen sind sie öfters wurstförmig. In alten Kulturen begegnet man oft sehr langgestreckten, mycelähnlichen Zellen. Die Temperaturgrenzen für die makroskopische Entwicklung in Würze sind 36—38° C und 3—8° C. Das Aussehen der Kolonien auf Plattenkulturen auf Würzegelatine bei Zimmertemperatur ist bisweilen dem eines Becherpilzes (*Peziza*) oder einer Flechte ähnlich. Die Oberfläche der Kolonien ist bei höheren Temperaturen glatt, bei 18° C und darunter stark runzelig oder gefalten, oft gelblich. Hautbildung findet kaum statt; öfters aber kommt eine starke Hefenringbildung zum Vorschein. Die Sporen sind rund oder oval, am häufigsten zu 2—4 in einer Zelle; sie bilden sich in großer Menge bei 16—18° C an der Oberfläche der Würzegelatine, auf sterilisierten Mohrrübenscheiben und auf Gipsblöcken, welche in Würze statt in Wasser angebracht sind. In gewöhnlichen Gipsblockkulturen entwickelt die Art nur sehr schwierig und oft gar keine Sporen. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken in Würze und auf Mohrrübenscheiben sind 27—28° C und 3—9° C. Die Art vergärt Dextrose und Maltose, aber nicht Saccharose und Lactose. Sie wurde aus dem Leibe der Honigbienen abgeschieden. Eine nahestehende oder vielleicht dieselbe Art wurde in Hummeln gefunden.

Bei der Gattung *Saccharomycodes* E. Chr. Hansen (9) entwickelt sich durch die Keimung der mit einer Membran versehenen Sporen ein Promycelium. Von diesem sowie von den vegetativen Zellen aus findet eine Sprossung mit unvollständiger Abschnürung der neuen Zellen statt. Es wird ein Mycel mit deutlichen Querwänden gebildet. Man kennt bisher zwei Arten:

Saccharomycodes Ludwigii E. Chr. Hansen. Synonyma: *Ludwig's Saccharomyces* E. Chr. Hansen (4) = *Saccharomyces Ludwigii* E. Chr. Hansen (5, 6 u. 8) = *Saccharomycodes Ludwigii* E. Chr. Hansen (9). Die Art ist bei Hansen (5 u. 6) und in Figur 18 auf S. 19 und in Figur 34 auf S. 37 abgebildet worden. Die Zellen sind von sehr verschiedener Gestalt; die Citronenform ist jedoch die vorherrschende. Die Temperaturgrenzen für die Sprossung in Würze sind 37—38° C und 1—3° C. Die Sporen werden nicht nur auf Gipsblöcken und auf Gelatine sondern auch in Nährflüssigkeiten, z. B. in 10-proz. Saccharoselösung, gebildet; sie sind rund und haben 3—4 μ im Durchmesser. Nach Nielsen (1) sind die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken 32—34° C und 2.5—7.5° C; das Optimum liegt bei 30° C. Die Art vergärt nach Hansen Dextrose und Saccharose, aber nicht Maltose. In Dextrose-

Hefenwasser kann sie bis 10 Vol.-Proz., in Würze nur 1,2 Vol.-Proz. Alkohol bilden. Sie wurde von LUDWIG und von HANSEN im Schleimflusse der Eichen gefunden.

Zu dieser seltenen Gattung gehört außerdem eine von J. BEHRENS (1) gefundene und ausführlich beschriebene Art, welcher jedoch von ihm 5 kein Name gegeben wurde. Ich deshalb schlage vor, sie

Saccharomycodes Behrensianus KLÖCKER zu benennen. Deren Zellen sind groß, rund oder oval. Die Sporen sind kugelig, 4—4,5 μ groß; sie werden am häufigsten in einer Anzahl von 2—3 in einer Zelle gebildet und zwar bei 18—20° C nach 22 Stunden. Zur Hautbildung kommt es 10 bei dieser Art nicht. Die Riesenkolonie auf 10-proz. Mostgelatine besitzt ein außerordentlich zierliches Aussehen. Sie zeigt eine sehr feine konzentrische Streifung rings um die kraterförmig eingesenkte, dunkler gefärbte Mitte. Die Randteile der Kolonien sind rein weiß, die mittleren älteren etwas dunkler, gelblich gefärbt. In den Riesenkolonien finden 15 sich viele Zellen mit Sporen. Vergoren werden Dextrose, Lävulose und Maltose, aber nicht Saccharose, Lactose und Galactose. Sie wurde auf Hopfen gefunden; vergl. Bd. V, S. 166.

In der Gattung *Saccharomycopsis* SCHIÖNNING (2) ist die Spore mit zwei Membranen versehen: bei der Keimung öffnet sich das Exosporium 20 bei den zwei bekannten Arten in verschiedener Weise. Im übrigen stimmen die Charaktere, soweit sie bekannt sind, am meisten mit denjenigen der Gattung *Saccharomyces* überein.

Saccharomycopsis guttulatus (ROBIN). Synonyma: *Cryptococcus guttulatus* ROBIN (1) = *Saccharomyces guttulatus* autt. = *Saccharomyces guttu-* 25 *latus* WILHELMI (1) = *Saccharomycopsis guttulatus* SCHIÖNNING (2). Eine Abbildung dieser Art findet sich bei WILHELMI und in Figur 35 auf S. 37. Die nachfolgende Beschreibung rührt im wesentlichen von WILHELMI (1) her. Danach handelt es sich hier um ellipsoidische, länglichovale Zellen mit abgestumpften Enden, 6—16 μ lang, 2—4 μ breit, mit 30 linearer oder wirtelähnlicher Sprossung. Die Optimal-Temperatur für die Sprossung ist 35—37° C. Ueber die Hautbildung ist nichts bekannt. Es entstehen 1—4 länglich-ovale Sporen in einer Zelle. Bei der Keimung wird das Exosporium entweder an den Polen oder an der Seite durchbrochen, und zwar immer mit unregelmäßigem Rande. Nach und nach 35 schrumpft das Exosporium zu einem kleinen Reste von unbestimmter Form zusammen. Diese Art gedeiht auf mehreren künstlichen Nährböden, z. B. auf weinsaurem Glycerinagar mit einem Zusatze von Dextrose. Sie vergärt Dextrose und Saccharose und wurde in dem Verdauungskanale der Kaninchen, seltener in demjenigen der Meerschweinchen 40 und in den Exkrementen dieser Tiere gefunden.

Saccharomycopsis capsularis SCHIÖNNING (2) ist bei letztgenanntem Forscher und in Figur 22 auf S. 28 und in Figur 36 auf S. 38 abgebildet worden. Die Zellen sind bald eiförmig, bald wurstförmig. Auch typische Mycelbildung mit Querwänden kommt zustande. Die Temperatur- 45 grenzen für die Sprossung in Würze sind 38,5° C und ca. 0,5° C; das Optimum liegt bei 25—28° C. Diese Art bildet ziemlich schnell eine deutlich weiße, unebene, zottige Haut auf flüssigen Nährböden; auf festen hingegen entwickelt sich eine mehr oder minder unebene, weiße, zottige Vegetation, die auf Würzegelatine-Agar beim Stehenlassen von chokoladen- 50 brauner Farbe ist. Die Sporen sind in der Regel flachgedrückt-kugelig mit dem größten Durchmesser von 3,5—8 μ. Gewöhnlich entstehen 4 Sporen in einer Zelle. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung

auf Gipsblöcken sind 34,5—35° C und 5—8° C; das Optimum liegt bei 25—28° C. Bei der Keimung der Sporen öffnet sich das Exosporium mit zwei in der Regel ungleich großen Klappen, welche oft an einem Punkte in Verbindung und lange Zeit an der keimenden Spore sitzen 5 bleiben. Das Exosporium färbt sich mit konzentrierter Schwefelsäure und mehreren anderen konzentrierten Mineralsäuren rosa. Diese Art gedeiht gut in Würze, Hefenwasser, auf Würzegelatine, Würzegelatine-Agar, Hefenwassergelatine, Reis, Brot. Sie vergärt Dextrose, Lävulose und Maltose, aber nicht Saccharose, Lactose und Raffinose. Sie wurde 10 in Erde von einer Grasweide in den schweizerischen Hochalpen gefunden.

§ 41. Die Gattungen Pichia und Willia. Die zweifelhaften Gattungen Monospora und Nematospora.

Die zweite Hauptgruppe der echten Saccharomycetaceen (s. S. 171) umfaßt die Gattungen *Pichia* und *Willia*, deren Arten in zuckerhaltigen 15 Nährflüssigkeiten sofort eine Kahmhaut bilden, welche durch Einschlüsse von Luftblasen trocken und matt erscheint und sich deutlich von der Hautbildung der in den §§ 39 und 40 beschriebenen Gattungen unterscheidet. Die Sporen sind von verschiedener Gestalt, mit oder ohne vorragende Leiste, und haben nur eine Membran. Viele Arten 20 zeichnen sich durch ihre Esterbildung aus, einige rufen keine Gärung hervor.

In der Gattung *Pichia* E. Chr. Hansen (9) sind die Sporen rundlich oder halbkugelig oder unregelmäßig und eckig. Gärung wird nicht erregt. Starke Mycelbildung ist vorhanden. Von dieser Gattung kennt 25 man u. a. nachbenannte acht Arten:

Pichia membranaefaciens E. Chr. Hansen. Synonyma: *Saccharomyces membranaefaciens* E. Chr. Hansen (3 u. 8) = *Pichia membranaefaciens* E. Chr. Hansen (9). Eine Abbildung dieser Art findet sich bei Seifert (1). Die Kahmhaut besteht aus wurstförmigen und langgestreckt-ovalen 30 Zellen, welche reich an Vakuolen sind. Die Temperaturgrenzen für die Sprossung auf Würze sind 35—36° C und 0,5° C. Die Kolonien auf Würzegelatine sind mattgrau, oft mit einem rötlichen Ton. Die Würzegelatine wird sehr schnell verflüssigt. Die Sporen sind rundlich oder halbkugelig. Sie werden in großer Menge sowohl auf Gipsblöcken als 35 auch in den Kahmhäuten gebildet. Nach Nielsen (1) sind die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken 33—35° C und 2,5—7,5° C; das Optimum liegt bei 30,5—31° C. Nach Seifert wächst die Art noch bei Anwesenheit von 12,2 Vol.-Proz. Alkohol. Sie wurde von Hansen in einer schleimigen Masse gefunden, die an den beschädigten Wurzeln 40 einer Ulme entstanden war. Koehler fand später den Pilz in unreinem Brunnenwasser und A. Jörgensen in Weißweinen.

Pichia membranaefaciens II (Pichi). Synonym: *Saccharomyces membranaefaciens II* Pichi (1). Die Art ist bei Pichi (1) abgebildet. Die Zellen sind 5—7 μ lang und 3,5 μ breit oder 10—19 μ lang und 3—4,5 μ 45 breit. Die Sporen sind oft rund oder aber auch ein wenig zusammengedrückt oder abgeplattet. Ihr Durchmesser beträgt 2,5—3 μ. Gewöhnlich entstehen 3—4 Sporen in einer Zelle. Die Asken in der grobrunzeligen, milchweißen Haut sind oval, 6—8 μ lang und 3—5 μ breit. Auf Würze entstehen, bei 22—25° C, nur wenige Asken. Diese Art 50 wurde auf den Blättern von *Evonymus europaeus* gefunden.

Pichia membranaefaciens III (PICHI). Synonym: *Saccharomyces membranaefaciens III* PICHI (1). Eine Abbildung der Art gibt der letztgenannte Forscher. Die Zellen sind 5—7 μ lang und 3—4,6 μ breit. Die Sporen haben 2,5—3,5 μ im Durchmesser. Die Asken sind kugelrund oder oval, zwei- bis viersporig, 5—8 μ lang, 3—5 μ breit. Die Haut auf Würze bei 22—25° ist gleichmäßig, dünn und glatt und enthält eine reichliche Menge von Asken. Diese Art wurde in „Vin des Côtes" gefunden.

Pichia californica (SEIFERT). Synonym: *Saccharomyces membranaefaciens var. californicus* SEIFERT (1). Diese Art ist bei dem eben genannten Forscher abgebildet. Die Zellen sind meist oval, hin und wieder ein stark lichtbrechendes Körperchen enthaltend, 4—8 μ lang, 3—5 μ breit. Die Häute sind zart, leicht zu Boden sinkend, weiß. Die Sporen entstehen zu 2—4 in einer Zelle, sind kugelig, 2—3 μ groß, mit homogenem, stark lichtbrechendem Plasma. In den Häuten werden bei gewöhnlicher Zimmertemperatur nur wenige sporenführende Zellen gefunden. Die Sporenbildung blieb auf Gipsblöcken bei 39—40° C und bei 5—6° C aus; das Optimum liegt bei 34° C. In Weinen mit 8 Vol.-Proz. Alkohol ist für das Wachstum das Temperaturmaximum 33° C, das Minimum 7—12° C und das Optimum 28—30° C. (In Bierwürze sind die Grenzen viel weiter, z. B. Maximum höher als 39° C; sie sind aber von SEIFERT nicht angegeben worden.) Die Art wächst noch bei einem Alkoholgehalt von 12,2 Vol.-Proz. Sie wurde in kalifornischem Rotwein gefunden.

Pichia taurica (SEIFERT). Synonym: *Saccharomyces membranaefaciens var. tauricus* SEIFERT (1). Die Art ist bei dem letztgenannten Forscher abgebildet. Die Zellen sind meist wurstförmig, langgestreckt, selten oval, bis 20 μ lang, 4—6 μ breit. Die Häute sind zart, sinken leicht zu Boden und enthalten nach kurzer Zeit bei Zimmertemperatur sehr reichlich sporenführende Zellen. Die Sporen sind oval, 4—6 μ lang, 3—4 μ breit. Auf Gipsblöcken trat bei 34° C und bei 4—6° C keine Sporenbildung mehr ein. Am raschesten fand sie bei 27—30° C statt. In Weinen mit 8 Vol.-Proz. Alkohol ist für das Wachstum das Temperaturmaximum 28—30° C, das Optimum 22° C und das Minimum 5—6° C. Diese Art wächst nicht mehr bei einem Alkoholgehalt von 12,2 Vol.-Proz. Sie wurde in Krimwein gefunden.

Pichia tamarindorum (SEIFERT). Synonym: *Saccharomyces membranaefaciens var. Tamarindorum* SEIFERT (1). Der letztere Forscher hat von dieser Art eine Abbildung gegeben. Die Zellen sind zumeist sehr langgestreckt, selten oval oder birnförmig, häufig mit einem stark lichtbrechenden Körperchen im Protoplasma. Die langgestreckten Zellen sind bis 26 μ lang und 2—6 μ breit, die kleinen ovalen Zellen 5—6 μ lang und 2—3 μ breit. Die Häute sind dicht und von weißem, staubigem Aussehen, bei älteren Kulturen runzelig; bei Erschütterung fallen sie in größeren Flocken zu Boden. Die Sporen sind fast halbkugelig, gegen 3 μ hoch, bei 4 μ größtem Durchmesser; sie zeigen gewöhnlich ein zentrales, stark lichtbrechendes Körperchen. Die Abplattung ist in der Mitte häufig etwas vorgewölbt, der Rand ebenfalls schwach vorspringend. In den Häuten werden bei gewöhnlicher Zimmertemperatur sehr bald und reichlich Sporen gebildet. Auf Gipsblöcken wurden bei 34° C und bei 1,5° C keine Sporen mehr gebildet. Am raschesten trat die Sporenbildung bei 27—30° C ein. Riesenkolonien auf Würzegelatine zeigen eine eigentümliche netzartige Struktur. Diese Art wurde auf Tamarindenmus und auf einem damit bereiteten weinähnlichen Getränk gefunden.

Pichia farinosa (Lindner). Synonyma: *Saccharomyces farinosus* Lindner (2) = *Pichia farinosa* E. Chr. Hansen (9). Diese Art ist bei Lindner (2) abgebildet. Die Zellen sind schmächtig. Insbesondere ältere Zellen weisen nicht selten eckige Umrisse auf. In der Haut treten reichlich Sporen auf. Bei 37° C wird keine Haut mehr gebildet. Diese ist blendend weiß, wie zerknittertes Seidenpapier gefaltet und wie mit Mehl bestreut. In alten Kulturen auf Würzegelatine wird letztere verflüssigt. Diese Art wurde in Danziger Jopenbier (s. S. 119) und von K. Saito (2) in Japan in Soja-Sauce gefunden.

Pichia Radaisii (Lutz). Synonym: *Saccharomyces Radaisii* Lutz (1). Die Zellen dieser Art sind länglich-oval, 8—8,5 μ lang, 3—3,5 μ breit; die Dicke der Wand beträgt 0,8 μ. Die Sporen sind rund, gewöhnlich zu vieren in einer Zelle und haben 1,4 μ im Durchmesser. Sie werden auf Gipsblöcken bei 22—23° C schon nach 12 Stunden gebildet. Die Maximal-Temperatur für die Sporenbildung ist 25—28° C. Das Optimum für die Hautbildung liegt bei 23° C; bei 37—38° C hört alle Entwicklung auf. Die Art verflüssigt nicht die Gelatine, und die Kolonien auf diesem Nährboden färben sich nach einiger Zeit rot. Sie wurde in „Tibi", der in Mexiko zur Darstellung eines Getränkes benutzt wird, gefunden; vergl. Bd. V, S. 256.

In der Gattung *Willia* E. Chr. Hansen (9) sind die Sporen hut- oder citronenförmig mit vorragender Leiste. Die meisten Arten sind kräftige Esterbildner, einige wenige sind unfähig, Gärung hervorzurufen. Zu dieser Gattung zählen nachfolgende sieben Arten:

Willia anomala E. Chr. Hansen. Synonyma: *Saccharomyces anomalus* E. Chr. Hansen (5 u. 8) = *Willia anomala* E. Chr. Hansen (9). Die Art ist bei Hansen (5) und in Figur 25 auf S. 31 und in Figur 33 auf S. 36 abgebildet. Das mikroskopische Bild der Zellen erinnert an eine *Torula*. Sie sind klein, oval, bisweilen wurstförmig; besonders in älteren Kulturen begegnet man letzteren oft. Die Temperaturgrenzen für die Sprossung in Würze sind 37—38° C und 0,5—1° C. Die Kahmhaut ist am Anfange der Gärung matt grau; während der Gärung wird die Flüssigkeit trübe. Nach einiger Zeit kann man sowohl in der Kahmhaut als auch in der Bodensatzhefe Zellen mit Sporen finden. Es entstehen 2—4 Sporen in einer Zelle. Sie sind halbkugelig mit einer vorragenden Leiste am Rande der Grundfläche, so daß sie ein hutförmiges Aussehen bekommen. Der Durchmesser der Grundfläche ohne die Leiste beträgt 2—3 μ. Nielsen (1) befand die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken zu 32—34° C und 2,5—7,5° C; das Optimum liegt bei 30° C. Während der Gärung entsteht ein starker Geruch nach Fruchtester. Nach Nielsen bildet diese Art in Würze nach 11 Tagen nur 0,9 Vol.-Proz. Alkohol und Ester; letzterer ist nach Seifert Essigsäureäthylester. Dem letztgenannten Forscher zufolge verbrennt der Pilz den Alkohohl zu Wasser und Kohlensäure, und zuletzt wird auch der Essigester zerstört. Nach Nielsen vergärt *W. anomala* Dextrose, aber nicht Maltose und Lactose, und sondert kaum Invertin ab; nach anderen Untersuchungen aber ist die Invertinbildung eine deutliche. Diese Art wurde zuerst von Hansen in einer unreinen Brauereihefe aus Bayern entdeckt; später ist sie in englischen Bieren, auf Grünmalz (s. Bd. V, S. 164), auf Kleie, in Eibischsaft, in der Erde und auf Obstfrüchten, z. B. auf Pflaumen, gefunden worden. In dem bei der Sakébereitung verwendeten Koji (s. Bd. V, S. 248) ist sie auch vorhanden, was durch Klöcker und Schiönning (1), Kozai (1) und

Saito (1) dargetan worden ist. Auch in jenem Koji, welcher bei der Herstellung von „Awamori“ auf den Luchu-Inseln benutzt wird, ist sie nach Inui (1) vorhanden (s. d. 11. Kap.). P. Lindner (4) fand die Art in dem armenischen Getränke **Mazun** (s. Bd. II, S. 135).

Willia anomala I (Steuber). Synonym: *Saccharomyces anomalus var. I* Steuber (1). Diese Art ist von ihrem Entdecker abgebildet worden. Die Haut auf Würze ist anfangs glatt, kreideweiß, später gefaltet und gelblich. Die Temperaturgrenzen für die Hautbildung sind 37—42° C und 5—10° C. Die Riesenkolonien auf 10-proz. Würzegelatine sind in der Mitte gelblich, am Rande weiß, seidenglänzend. Im mittleren Teile der Kolonie findet man Riesenzellen bis 15 μ, am Rande Zellen bis 30 μ lang. Die Gelatine wird verflüssigt. Die Sporen sind hutförmig und werden sowohl in der Haut als auch auf Gelatine und in Gipsblockkulturen gebildet. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 30—35° C und 5—12° C. Die Art vergärt Dextrose, Lävulose und Saccharose, nicht Maltose, Lactose und Galactose. Sie bildet Essigester und Essigsäure und wurde in Hefenwaschwasser gefunden.

Willia anomala II (Steuber). Synonym: *Saccharomyces anomalus var. II* Steuber (1); hier auch Abbildung. Die Haut auf Würze ist anfangs glatt, kreideweiß, später faltig, nach einiger Zeit rosa bis braunrosa. Die Temperaturgrenzen der Hautbildung sind 30—35° C und 5 bis 10° C. Die Riesenkolonien auf Würzegelatine werden nach einiger Zeit rosa bis braunrot. Die Gelatine wird verflüssigt. Die Sporen sind hutförmig. Die Sporenbildung ist sehr reichlich. Die Temperaturgrenzen für diese auf Gipsblöcken sind 30—35° C und 5—15° C. Ueber das Verhalten zu den Zuckerarten sagt Steuber: „Invertiert und vergärt vollständig aber sehr langsam eine 10-proz. Saccharoselösung; in einer 10-proz. Lävuloselösung wird nur 0,45 Proz. Alkohol gebildet. Vergärt nicht Dextrose, Lactose, Galactose und Maltose, vermag nur in derartigen Lösungen höchstens Spuren von Alkohol zu bilden. Erzeugt keinen Essigäther.“ Es scheint aber hier ein Irrtum vorzuliegen; wenn eine Hefe nicht Dextrose zu vergären vermag, kann sie auch nicht eine invertierte Saccharoselösung vollständig vergären.

Willia anomala III (Steuber). Synonym: *Saccharomyces anomalus var. III* Steuber (1); hier auch Abbildung. Die Haut ist anfangs weiß, später gelblich. Die Temperaturgrenzen für die Hautbildung sind 30 bis 35° C und 5—15° C. Die Riesenkolonien auf Würzegelatine sind weiß, unregelmäßig. Die Gelatine wird verflüssigt. Die Sporen sind hutförmig. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 30—35° C und 5—15° C. „In einer 10-proz. Lävuloselösung wird nach 4 Wochen 0,4 Proz. Alkohol gebildet. Vergärt nicht Dextrose, Saccharose, Lactose, Galactose und Maltose. Bildet keinen Essigäther.“

Willia anomala IV (Steuber). Synonym: *Saccharomyces anomalus var. IV* Steuber (1); hier auch Abbildung. Die Haut ist weiß, später gelblich. Die Temperaturgrenzen für die Hautbildung sind 35—41° C und 5—15° C. Die Riesenkolonien auf Würzegelatine sind weiß, später gelblich, faltig. Die Gelatine wird verflüssigt. Die Sporen sind hutförmig. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 30—35° C und 15—20° C. „Bildet in einer 10-proz. Lävuloselösung 0,52 Proz. Alkohol, jedoch ohne Gärungserscheinungen. Vergärt nicht Dextrose, Saccharose, Lactose, Galactose und Maltose. Bildet nicht Essigäther.“

Willia belgica (LINDNER). Synonym: *Saccharomyces anomalus var. belgicus* LINDNER (3). Die Art ist bei letztgenanntem Forscher abgebildet. Sie wächst auf Würze in Form einer rahmigen, punktierten Kahmhaut. Die Zellen sind verhältnismäßig klein, dünnwandig und inhaltsarm. Die
5 hutförmigen Sporen kommen meist so dicht zusammengedrängt vor, daß man fast nur die scharfen Linien der Ansatzleisten (Krempen) sieht. Diese Art vergärt keine der bekannten Zuckerarten, erzeugt auch keinen Fruchtester. Sie wurde in belgischem Bier gefunden.

Willia Saturnus (KLÖCKER). Synonym: *Saccharomyces Saturnus*
10 KLÖCKER (3). Abbildungen von dieser Art finden sich bei KLÖCKER (3) und in Figur 26 auf S. 31. Die Haut ist weiß, gerunzelt. Die Zellen sind rund oder oval, selten langgestreckt, gewöhnlich 4—6 μ lang. Die Temperaturgrenzen für die Sprossung auf Würze sind 35—37° C und 2—4° C. Die Sporen sind mehr oder minder deutlich citronenförmig
15 mit einer Leiste um die Mitte von Spitze zu Spitze, ca. 3 μ lang, mit einem lichtbrechenden, kugeligen Körperchen in der Mitte. Die Temperaturgrenzen für die Sporenbildung auf Gipsblöcken sind 28—31,5° C und 4—7° C; das Optimum liegt bei ca. 25° C. Diese Art vergärt Dextrose, Lävulose, Raffinose und Saccharose, letztere nach vorausgegangener
20 Inversion, nicht Maltose, Lactose und Arabinose. Sie bildet während der Gärung einen Ester (Essigester?). Sie wurde in Erdproben vom Himalaja gefunden. Dieselbe oder eine ihr nahestehende Art wurde in Erde aus Dänemark und aus Italien mehrmals gefunden. —

Die Besprechung der Gattungen *Monospora* und *Nematospora* soll
25 hier angeschlossen werden. Daß deren Zugehörigkeit zur Familie der Saccharomycetaceen unsicher ist, wurde schon auf S. 171 bemerkt.

Der Name der Gattung *Monospora* METSCHNIKOFF (1) sollte eigentlich durch einen anderen ersetzt werden, da er schon früher von HOCHSTETTER an eine Flacourtiacee vergeben worden ist. Bei *Monospora*
30 METSCHNIKOFF ist die Spore nadelförmig und keimt durch Bildung eines seitlichen Promycels, von welchem aus die Sprossung stattfindet. In einer Zelle wird nur eine Spore gebildet. Man kennt von dieser Gattung nur eine Art, nämlich *Monospora cuspidata* METSCHNIKOFF (1), die bei letztgenanntem Forscher abgebildet ist. Die Zellen sind langgestreckt-
35 oval. Die Asken sind sehr lang, wurst- oder keulenförmig; in einem Ascus entsteht nur eine lange, nadelförmige, an beiden Enden zugespitzte Spore. Diese Art lebt parasitisch in der Leibeshöhle der Flohkrebse (*Daphnia*). Seit METSCHNIKOFF die Art entdeckt hat, ist sie nicht wieder gefunden worden.

40 In der Gattung *Nematospora* PEGLION (1) ist die Spore langgestreckt, spindelförmig, mit einer langen Geißel am einen Ende. Die Keimung geht durch Sprossung an dem einen oder an beiden Enden vor sich. In einer Zelle entstehen mehrere Sporen. Bisher ist eine Art beschrieben worden, nämlich

45 *Nematospora Coryli* PEGLION (1), die bei letztgenanntem Forscher abgebildet ist. Die Zellen sind langgestreckt, in alten Kulturen rund oder oval, mit doppelter, glänzender Wand. Die Sprossung findet vom Ende der Zelle aus statt, ähnlich wie bei *Dematium*. In Nährflüssigkeit findet keine Sprossung sondern nur Mycelbildung statt. Der Ascus ist
50 wurstförmig, 65—70 μ lang und 6—8 μ breit; er enthält 8 Sporen, welche in 2 Bündeln in der Richtung der Längsachse liegen, 4 Sporen in jedem Bündel. Die Länge der Sporen beträgt 38—40 μ ohne die Geißel, welche 35—40 μ lang ist. Die Dicke der Spore beträgt 2—3 μ.

Ehe die Keimung der Spore stattfindet, verliert sie die Geißel und wird dicker und kürzer. Diese Art gedeiht am besten auf sterilisierten Zuckerrüben, auf welchen auch die Sporenbildung vor sich geht. Sie entwickelt sich auch auf neutraler Fleischsaftgelatine, gedeiht aber in Nährflüssigkeiten sehr schlecht. Sie wurde in Haselnüssen in Italien gefunden.

§ 42. Die Familie der Schizosaccharomycetaceen.

Die Arten dieser Familie sind einzellige Pilze, welche sich durch Querteilung vermehren und Endosporenbildung besitzen. Der Spaltung einer Zelle geht das Auftreten einer Querwand voraus, die sich sogleich von außen nach innen zu in zwei Lamellen zu zerlegen beginnt. Sprossung tritt nicht auf. Jede Zelle kann als Sporenmutterzelle auftreten. Die Sporen sind einzellig. Sie entstehen in der Anzahl von 1—8 in einer Mutterzelle. Zu dieser Familie gehört derzeit nur eine Gattung, das ist

Schizosaccharomyces P. LINDNER (1), deren Gattungsmerkmale also die Familiencharaktere sind. Die Ascusbildung tritt in einigen Fällen nach vorhergehender Fusion ein. Alle bis jetzt bekannten drei Arten besitzen Sporen, welche sich mit Jod-Jodkalium blau färben; vergl. S. 47. Die Arten rufen in verschiedenen Zuckerlösungen Gärung hervor. Nach GUILLIERMOND enthalten die Zellen (im Gegensatze zu denen der Saccharomycetaceen) niemals Glycogen; s. S. 96—97.

Schizosaccharomyces Pombe LINDNER (1) ist bei letztgenanntem Forscher abgebildet. Die Zellen sind cylindrisch, 5—9 μ lang, 4—9 μ breit; übrigens wechselt die Größe sehr stark. Die beiden Enden einer Zelle haben zumeist ein verschiedenes Aussehen: das eine Ende ist abgerundet, das andere von einem scharf gezeichneten Ring umgeben, welcher das neugebildete und schon kegelförmig aufgetriebene Membranstück einfaßt. Nicht selten treten hantelförmige Zellen auf. In erschöpfter Nährlösung werden die Zellen kürzer. Bei beschränktem Luftzutritt wachsen manche Zellen zu sehr langen Schläuchen aus, in denen eine Anzahl von Querwänden zum Vorschein kommt, ohne daß ein Zerfall in ebensoviele Teilstücke eintritt. Bei der Trennung zweier Teilstücke voneinander bleiben diese sehr oft noch an einem Punkte, um den sie sich wie um ein Scharnier drehen, in Verbindung. Der Ascus entsteht nach GUILLIERMOND (1) nach vorangegangenem Verschmelzen zweier Zellen, welche Schwesterzellen sein können. Er hat auch ein Verschmelzen dreier Zellen beobachtet. Die Sporenbildung tritt verhältnismäßig leicht auf, sogar schon im hängenden Würzetropfen. Nach 7 Tagen können die ersten Sporen vorhanden sein. In der gärenden Flüssigkeit finden sich am Ende der Hauptgärung in der Bodensatzhefe Sporen. Die Zahl der Sporen beträgt 1—4. Sie sind stark glänzend und haben ca. 4 μ im Durchmesser. Die Keimung der Spore beginnt mit einer Anschwellung und mit der Bildung eines Keimschlauches. Die Sporenhaut wird bei der Keimung nicht gesprengt, sondern geht an der betreffenden Stelle in die neue Haut über. Sobald der Keimschlauch ungefähr die Länge einer gewöhnlichen vegetativen Zelle erreicht hat, teilt er sich durch eine Querwand und zerfällt in zwei Hälften. Hautbildung tritt nicht ein. Bei hohen Temperaturen hat die Gärung in Bierwürze den Charakter einer Obergärung. Die Art vergärt Dextrose, Maltose und Saccharose und außerdem noch Lävulose, Inulin, Dextrin und Raffinose; sie kann

jedoch nicht d-Mannose vergären (Unterscheidungsmerkmal von *Schizos. mellacei*). Eine gekochte Maische aus Malz, Kartoffelstärke und Saccharose wurde von 27,7 Proz. Balling auf 1,6 Proz. vergoren und enthielt dann 15,5 Vol.-Proz. Alkohol. Sie wurde in Pombe, d. h. Hirsebier aus 5 Afrika (s. Bd. V, S. 255), von SAARE gefunden und von ZEIDLER isoliert. Sie ist nach LINDNER mit gutem Erfolg in einer argentinischen Brennerei angewandt worden; vergl. Bd. V, S. 267.

Schizosaccharomyces octosporus BEIJERINCK (1) ist bei BEIJERINCK (1), bei SCHIÖNNING (1) sowie in Figur 2 auf S. 3 und in Figur 29 auf S. 33 10 abgebildet. Die Zellen sind in Bierwürzekulturen teils zylindrisch, teils oval, nach SCHIÖNNING 4,5—6 μ breit und 7—13 μ lang. Die Hefenringbildung tritt wie bei *Schizos. Pombe* ein. Die Asken sind regelmäßig oval, 6—10,5 μ breit, 14—20,5 μ lang, in der Regel mit 8 Sporen, häufig aber auch mit 4, selten mit 2—7. Die Sporen werden sowohl in der 15 Nährflüssigkeit wie auch, und zwar besonders gut, auf festem Nährboden gebildet. Auf Gipsblöcken entstehen sie nach SEITER (1) bei 25° C schon nach 6—7 Stunden. Die Ascusbildung geht bei dieser Art auf drei verschiedene Weisen vor sich: 1. Auf die von SCHIÖNNING entdeckte und auf S. 33 beschriebene Weise dadurch, daß eine Zelle sich in zwei 20 Tochterzellen teilt, welche wieder verschmelzen. 2. So, daß zwei Zellen, welche nicht durch Teilung ein und derselben Zelle hervorgegangen sind, verschmelzen (GUILLIERMOND). Und 3. ohne irgend ein Verschmelzen der Zellen (GUILLIERMOND). Die Art bildet keine Haut sondern nur einen schwachen Hefenring und verflüssigt schnell die Würzegelatine. Sie 25 vergärt Dextrose, Maltose und Lävulose und nach LINDNER ferner Dextrin, Raffinose und d-Mannose. Saccharose kann sie nicht vergären. Nach SCHIÖNNING bildet sie in Würze (von 14 Proz. Balling) unter schwachen Untergärungserscheinungen bei 25° C nach 3 Wochen 4,6 Vol.-Proz. Alkohol und nach 5 Monaten 6,56 Vol.-Proz. Sie wurde von BEIJERINCK 30 auf Korinthen, von SCHIÖNNING auf Rosinen gefunden.

Schizosaccharomyces mellacei (ALFR. JÖRGENSEN). Synonym: *Saccharomyces mellacei* ALFR. JÖRGENSEN (1). Die Art ist bei letztgenanntem Forscher abgebildet. Die Zellen sind 8—12 μ lang und 4—6 μ breit und ähneln denjenigen von *Schizos. octosporus* und *Schizos. Pombe*. In 35 älteren Kulturen treten eigenartige barocke Zellformen auf. Der Ascus entsteht zufolge GUILLIERMOND (1) nach Verschmelzen zweier Zellen, welche oft Schwesterzellen sind. Bei einer Varietät dieser Art beobachtete derselbe Forscher jedoch ausschließlich Ascusbildung ohne irgend ein vorausgehendes Verschmelzen der Zellen. Die Sporen haben 40 ca. 4 μ im Durchmesser, sind länglich rund, in der Regel zu vieren in einer Zelle und stark lichtbrechend. Hautbildung tritt nicht ein, bloß Hefenringbildung. Diese Art vergärt nach LINDNER Dextrose, Maltose und Saccharose und außerdem noch Lävulose, Inulin, Dextrin und Raffinose. Sie unterscheidet sich von *Schizos. Pombe* durch ihre größeren 45 Abmessungen und ihre Fähigkeit, d-Mannose vergären zu können. In Bierwürze (von 10,5 Proz. Balling) erzeugt sie unter Obergärungserscheinungen 2,5 Gew.-Proz. Alkohol. Während der Gärung entwickelt sich ein angenehmes Aroma. Diese Art wurde von P. GREG in Rohrzucker-Melasse gefunden, welche bei der Rum-Gärung (s. 13. Kap. d. 50 V. Bds.) auf Jamaica angewendet wird.

Literatur

zum Kapitel Systematik der Saccharomycetaceen und der Schizosaccharomycetaceen.

*__Aderhold,__ R., (1) Landw. Jahrbücher, 1894, Bd. 23, S. 587. *__Artari,__ A., (1) Abh. d. naturf. Ges. zu Halle, 1897, Bd. 21, S. 113. *__Bail,__ (1) Flora, 1857, Bd. 40, S. 417. *__Barker,__ B. T. P., (1) Proc. of the Roy. Society, 1901, Bd. 68, und Philos. Transact. Roy. Society, London, 1901, Bd. 194, S. 467. *__Bau,__ A., (1) W. f. Brauerei, 1894, Bd. 11, S. 1366. *__Bay,__ J. Chr., (1) The American Naturalist, 1893, Bd. 27, S. 693. *__Behrens,__ J., (1) W. f. Brauerei, 1896, Bd. 13, S. 802. *__Beijerinck,__ M. W., (1) Centralbl. f. Bakt., 1894, Bd. 16, S. 49. *__Boutroux,__ L., (1) Bull. de la Soc. Linn. de Normandie, 1883, Bd. 7, und Ann. des sc. nat., Bot., 1884, Bd. 17, S. 196. *__Delbrück,__ M., (1) W. f. Brauerei, 1890, Bd. 7, S. 636. *__Duclaux,__ E., (1) Ann. Pasteur, 1887, Bd. 1, S. 573. *__Freudenreich,__ E. __von,__ und __Jensen,__ O., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1897, Bd. 3, S. 552. *__Grönlund,__ Chr., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1892, Bd. 15, S. 281. *__Grotenfelt,__ G., (1) Fortschr. der Medizin, 1889, Bd. 7, S. 131. *__Guilliermond,__ A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1901, Bd. 132, S. 175 u. 1194; Bd. 133, S. 242, und Ann. de la Soc. Bot. de Lyon, 1903. *__Hansen,__ E. Chr., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1883, Bd. 2, S. 13. — (2) Ebenda, 1886, Bd. 2, S. 106. — (3) Ann. de Micrographie, 1888, Bd. 1, S. 49, und Comptes rendus de Carlsberg, 1888, Bd. 2, S. 143. — (4) Centralbl. f. Bakt., 1889, Bd. 5, S. 638. — (5) Comptes rendus de Carlsberg, 1891, Bd. 3, S. 44. — (6) Ebenda, 1900, Bd. 5, S. 1. — (7) Ebenda, 1902, Bd. 5, S. 64. — (8) Ebenda, 1902, Bd. 5, S. 68. — (9) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 12, S. 529. *__Henneberg,__ W., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1903, S. 91. *__Inui,__ T., (1) Journ. of the Coll. of Science, Imp. Univ. Tokyo, 1901, Bd. 15, S. 465. *__Irmisch,__ M., (1) W. f. Brauerei, 1891, Bd. 8, S. 1135. *__Jensen,__ O., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 251. *__Jörgensen,__ Alfr., (1) Die Mikroorg. d. Gärungsindustrie. 1898. *__Kayser,__ E., (1) Ann. Pasteur, 1890, Bd. 4, S. 321. *__Klöcker,__ A., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1895, Bd. 4, S. 20. — (2) Ebenda, 1900, Bd. 5, S. 59. — (3) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 129, und Comptes rendus de Carlsberg, 1903, Bd. 6, S. 84. *__Klöcker,__ A., und __Schiönning,__ H., (1) Meddelelser fra Carlsberg Lab., 1896, Bd. 4, S. 120. *__Kozai,__ Y., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1900, Bd. 6, S. 385. *__Krueger,__ R., (1) Centralbl. f. Bakt., 1890, Bd. 7, S. 425. *__Kützing,__ F., (1) Phycologia generalis, 1843, S. 148. — (2) Species algarum, 1849, S. 145. *__van Laer,__ H., und __Denamur,__ (1) Monit. scientif., 1. Juli 1895. *__Lasché,__ A., (1) Der Braumeister, 1892, Bd. 5, S. 242, und Z. f. d. ges. Brauwesen, 1892, Bd. 15, S. 113. *__Lindner,__ P., (1) W. f. Brauerei, 1893, Bd. 10, S. 1298. — (2) Ebenda, 1894, Bd. 11, S. 153. — (3) Mikroskop. Betriebskontrolle usw., 1895. — (4) Desgl., 3. Aufl., 1901. — (5) Jahrb. d. Versuchs- u. Lehranst. etc. in Berlin, 1904, Bd. 7, S. 448. *__Lutz,__ L., (1) Bull. de la Soc. mycolog. de France, 1899, Bd. 15, S. 68 u. 157. *__Mach,__ Edm., und __Portele,__ K., (1) Landw. Versuchsstationen, 1892, Bd. 41, S. 233. *__Mazé,__ P., (1) Ann. Pasteur, 1903, Bd. 17, S. 11. *__Metschnikoff,__ (1) Virchows Archiv, 1884, Bd. 96, S. 177. *__Meyen,__ (1) Wiegmanns Archiv, 1838, Bd. 4, S. 100. *__Nielsen,__ J. Chr., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1894, Bd. 3, S. 176. *__Peglion,__ V., (1) Rendic. della R. Acad. dei Lincei, 1897, und Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1901, Bd. 7, S. 754. *__Pichi,__ P., (1) Annali della R. Scuola di Vitic. e di Enol. in Conegliano, 1892, Bd. 1. *__Reess,__ M., (1) Bot. Unters. ü. d. Alkoholgärungspilze, 1870. *__Reinke,__ O., (1) W. f. Brauerei. 1891, Bd. 8, S. 809. *__Robin,__ (1) Des végét. qui croissent s. les anim. viv., 1847. *__Roux,__ (1) Bull. Soc. chimique, Bd. 35, S. 37. *__Saccardo,__ (1) Sylloge Fungorum, 1895, Bd. 11, S. 457. *__Saccardo__ und __Sydow,__ (1) Sylloge Fungorum, 1902, Bd. 16, S. 818. *__Saito,__ K., (1) Journ. of the Coll. of Science, Imp. Univ. Tokyo, 1904, Bd. 19, Art. 18, S. 1. — (2) Botan. Mag., Tokyo, 1905, Bd. 19, S. 75. *__Schiönning,__ H., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1895, Bd. 4, S. 30. — (2) Ebenda, 1903, Bd. 6, S. 103. *__Seifert,__ W., (1) Ber. d. chem.-phys. Versuchsst. Klosterneuburg, 1899 1900, und Zeitschr. f. d. landw. Versuchsw. in Oesterreich, 1900, Heft 3. *__Seiter,__ O., (1) Studien ü. d. Abstammung d. Sacch. und Unters. ü. Schizosacch. octosp., Dissert., Erlangen 1896. *__Steuber,__ L., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1900, Bd. 23, S. 3. *__Turpin,__ (1) Comptes rend. de l'Ac., 1838, Bd. 7, S. 369. *__Ward,__ H. Marshall, (1) Philos. Transact. Roy. Society, London, 1892, Bd. 183, S. 125. *__Went__ und __Prinsen Geerligs,__ (1) Verhandl. der koninkl. Akad. v. Wetensch. te Amsterdam, 1895, Tweede Sectie, Deel 4, Nr. 2. *__Wilhelmi,__ A., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 305. *__Will,__ H., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1891, Bd. 14, S. 145. — (2) Ebenda, 1895, Bd. 18, S. 1; 1898, Bd. 21; 1899, Bd. 22; 1902, Bd. 25; 1904, Bd. 27. *__Wortmann,__ J., (1) Landw. Jahrbücher, 1892, Bd. 21, S. 901. *__Yabe,__ (1) Imp. Univ. Coll. of Agric., Tokyo, Bull., Bd. 3, S. 221. *__Zopf,__ (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1889, Bd. 7, S. 94.

Vierter Abschnitt.

Morphologie, Physiologie und Systematik einiger technisch wichtiger höherer Ascomyceten und verwandter Formen.

(*Manuskript-Einlauf: 4. Jan. 1906.*)

10. Kapitel.

Morphologie und Systematik der Familie der Aspergillaceen.

Von Prof. Dr. Carl Wehmer,
Dozent an der Technischen Hochschule zu Hannover.

§ 43. Systematische Stellung und Gliederung der Aspergillaceen.

Die systematische Stellung der durch eine Mehrzahl von Vertretern chemisch interessanten und auch technisch wichtigen Familie der *Aspergillaceae* als Ascomyceten innerhalb der Gruppe der *Plectascineae* 5 ist bereits auf S. 210 und 214 des I. Bandes gekennzeichnet worden: wir haben uns somit in der Hauptsache nur noch kurz mit ihrer Gliederung zu beschäftigen.

Die an die Gymnoasceen anschließenden Aspergillaceen, jenen gegenüber durch den Besitz berindeter Ascusfrüchte ausgezeichnet, 10 scheiden sich durch regellose Lagerung der Schläuche im Fruchtkörper von der Mehrzahl der *Euasci* (Pyrenomyceten, Discomyceten u. a.), durch ihre sehr kleinen Schlauchfrüchte dagegen von den sonst ähnlichen, doch meist große unterirdische Fruchtkörper aufweisenden trüffelartigen Pilzen (Elaphomyceten und Terfeziaceen). Die Asci der 15 meist nicht aufspringenden sondern bei der Reife geschlossen bleibenden oder regellos zerfallenden Fruchtkörper entwickeln 2–8 einzellige Sporen. Nach der Beschaffenheit der Sporenfrüchte, insonderheit aber nach dem Bau der sehr verschiedenartigen, oft ganz überwiegend oder ausschließlich vorhandenen Konidienträger gliedert Ed. Fischer (1) 20 neuerdings die Familie in rund 12 Gattungen, Schröter (1) zählte im Jahre 1893 deren nur vier, während G. Winter (1) im Jahre 1887 die

hierher gehörigen Genera mit in der Familie der *Perisporiaceae* (s. Bd. I, S. 211) unterbrachte. Nachstehend folgt eine
Uebersicht der Aspergillaceen-Gattungen nach Ed. Fischer (1).

A) Fruchtkörper mit meist pseudoparenchymatischer Peridie, im Inneren gleichmäßig mit Ascis erfüllt: 5

a) Fruchtkörper mit einem Hals oder einer vorgezogenen Papille . . . . *Microascus*
b) Fruchtkörper ohne Hals:
  α) Peridie mit spiralig eingerollten Anhängseln . . . . *Magnusia*
  β) Peridie mit geraden Haaren oder zottigem Haarkleid: 10
    I. Peridie von mehr oder weniger kohliger Beschaffenheit . . *Cephalosthea*
    II Peridie häutig . . . . *Aphanoascus*
  γ) Peridie ohne Anhängsel:
    I. Ohne Konidien, nur mit Brutzellen . . . . *Anixiopsis*
    II. Konidien in Ketten direkt am Mycel entstehend, außerdem als zweite Nebenfruchtform noch endogen entstehende Sporen . . . . *Thielavia* 15
    III. Konidien an Konidienträgern mit blasiger Endanschwellung, welche mit zahlreichen einfachen oder verzweigten Sterigmen besetzt ist, in Ketten . . . . *Aspergillus* 20
    IV. Konidien an sympodial verzweigten Konidienträgern, in Ketten . . . . *Allescheria*
    V. Konidien an pinselig verzweigten Konidienträgern . . . . *Penicillium*

B) Fruchtkörper rundlich bis birnförmig, mit dichter mehrschichtiger Peridie. Asci mit Capillitiumfäden untermischt. Dehiszenz der Fruchtkörper durch 25 scheitelständige Oeffnung oder Zerfall des oberen Teiles der Peridie.

a) Asci mit zackigen Ausbuchtungen, Sporen mit äquatorialem Saum *Emericella*
b) Asci ellipsoidisch, am Scheitel mit stumpflicher Hervorragung, Sporen mit feinen, haarartigen Stacheln . . . . *Amylocarpus*
c) Fruchtkörper knöllchenförmig, gestielt, mit dicker Peridie, von der sterile Adern im Fruchtkörperinneren ausgehen, welche das ascusführende Geflecht in mehrere Partien teilen . . . . . . *Penicillopsis* 30

Nicht mit dieser „natürlichen“ Familie der *Aspergillaceae* zu verwechseln ist die lediglich auf die Art des Baues des Konidienträgers hin aufgestellte Gruppe der *Aspergillaceae* als Unterabteilung 35 der Hyphomyceten-Ordnung der Mucedineen (s. Bd. I, S. 215), für die folgende, etwas von der Lindau's (2) abweichende, Gattungsübersicht gilt:

A) Konidienträger an der Spitze stets blasig bis kugelig angeschwollen:

I. Konidienträger unverzweigt:
  a) Konidienketten nur an der Spitze der Sterigmen entstehend: 40
    α) Sterigmen unverzweigt . . . . *Aspergillus* (*Citromyces* s. unten)
    β) Sterigmen verzweigt, bisweilen neben unverzweigten . . . *Sterigmatocystis*
  b) Konidienketten an der Spitze und unterhalb der Scheidewände entspringend . . . . *Dimargiris* 45
II. Konidienträger dichotom verzweigt . . . . . . *Dispira*

B) Konidienträger an der Spitze nicht (oder doch nicht regelmäßig) blasig angeschwollen:

I. Konidienketten an der Spitze von Sterigmen entspringend:
  a) Konidienträger mit regelmäßig wirtelig gestellten Zweigen, Konidien tonnenförmig . . . . *Amblyosporium* 50
  b) Konidienträger nicht regelmäßig wirtelig, einfach oder verzweigt. Konidien kugelig oder ellipsoidisch:
    α) Konidien nicht durch Schleim verbunden:
      1. Konidienträger unverzweigt, mit einem endständigen Büschel von Sterigmen, ohne oder mit blasiger Endanschwellung . . . . *Citromyces* 55

2. Konidienträger stets mehr oder minder regelmäßig verzweigt, ohne blasige Endanschwellung . . . . . . *Penicillium*

β) Konidien durch Schleim zu einem endständigen Köpfchen verbunden . . . . *Gliocladium*

II. Konidienketten ohne Sterigmen an der Spitze der Konidienträger entstehend . . . . *Briarea*

Die Zahl der für uns hier in Betracht kommenden Gattungen beschränkt sich auf vier: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Citromyces*, *Allescheria* (= *Eurotiopsis*), deren unterscheidende Merkmale zunächst einzig in der Konidienträgerform, nicht in der Art der überdies für die Mehrzahl der hierhergehörigen Spezies noch unbekannten Schlauchfrucht liegen. Letztere Arten hier auszuschließen und als „*Fungi imperfecti*" gesondert zu behandeln, erscheint ebensowenig angebracht wie etwa eine Abtrennung jener Mucorineen, welche Zygosporen bilden, von solchen, deren Zygosporen noch nicht bekannt sind; auch innerhalb dieser Familie liefert bekanntlich der Sporenträger vielfach die alleinigen Gattungsmerkmale. Wir umgrenzen die drei Hauptgattungen einstweilen also zweckmäßig allein nach der Konidienträgerform und ohne Rücksicht auf Vorhandensein oder besonderen Charakter der Schlauchfrucht, deren Betonung auch zu einer ganz veränderten Gruppierung führen würde; für Durchführung einer solchen wartet man zweckmäßig die Vervollständigung unserer entwicklungsgeschichtlichen Kenntnis der zahlreichen noch ausstehenden Arten ab. Zurzeit lassen sich die Formen mit aspergillus- und penicilliumartigen Konidienträgern in vier Gruppen zerlegen und zwar in Arten mit

a) weichhäutigen Ascusfrüchten von kontinuierlicher Entwicklung („Perithecien"): *Aspergillus glaucus*, *A. fumigatus*, *Penicillium luteum*,

b) derben Ascusfrüchten von diskontinuierlicher Entwicklung („Sklerotien"): *Penicillium glaucum*, *Aspergillus nidulans*,

c) steril bleibenden Sklerotien ohne Ascusbildung: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*,

d) keinerlei derartigen Organen: *Aspergillus Oryzae*, *Penicillium olivaceum* u. a. Hierher das Gros der Arten.

Die beiden letzten Gruppen können einstweilen nur provisorische sein, aber auch zwischen der ersten und der zweiten gibt es Uebergänge (*A. nidulans* nähert sich der ersten), und schließlich stimmen weder die Perithecien noch die Sklerotien der einzelnen Arten nach Entwicklung und Bau immer überein, weisen vielmehr erhebliche Unterschiede auf (s. Blasenhülle!), so daß wir auch da wieder trennen müßten. Schon die Schlauchfrucht von *P. luteum* ähnelt mehr einem *Gymnoascus* als der von *A. glaucus*. Die ohne gleichzeitige Berücksichtigung von *Penicillium* vorgeschlagene Zerlegung der „Formgattung" *Aspergillus* in die Gattungen *Eurotium* (= a), *Aspergillus* (= b u. c) und *Euaspergillus* (= d), denen dann noch die weitere (allein wieder auf den Konidienträgerbau hin aufgestellte) Gattung *Sterigmatocystis* (*St. nidulans* mit Ascusfrüchten) zugefügt wurde, kann also kaum befriedigen. Sie ist auch nicht recht motiviert, solange innerhalb der Gattung *Penicillium* nicht die gleiche Trennung in perithecien-, bez. sklerotienbildende und sterile Formen durchgeführt wird; schließlich wären dann aber, wenn man den Konidienträger als (wenn auch nur provisorisches) Gattungsmerkmal ganz fallen läßt, beide zusammenzulegen. Gegenüber der früheren Uneinigkeit der Forscher — man vergleiche da die Arbeiten von A. de Bary (2), van Tieghem (2), Winter (1) u. a. — macht sich heute erfreulicherweise im ganzen wieder der verständliche Wunsch nach Zusammenfassung aller Formen unter einheitlicher Bezeichnung (*Aspergillus*) geltend; ihm tragen auch bereits

Schröter (1), der nur noch *Sterigmatocystis* abtrennt, sowie in vollem Umfange Ed. Fischer (1) durch Einziehung auch der Gattung *Eurotium* Rechnung. Zurzeit ist dieser Standpunkt auch wohl der empfehlenswertere. Ob wir überhaupt in die Lage kommen werden, die Systematik der Aspergillaceen allein auf die Fruchtform begründen zu können, bleibe — so wünschenswert das auch erscheint — dahin gestellt. Der heutige, auch wohl mehr dem strengen Systematiker als ein solcher erscheinende, Uebelstand ist vielleicht geringer als der, welcher durch Zerreißen der durch den Konidienträger charakterisierten Gruppen entstehen würde, wobei ja notwendig ganz verschiedene Konidienformen (*Aspergillus, Penicillium* u. a.) in die gleiche Gattung kämen und so die Konidienträger zu bloßen Speziesmerkmalen werden müßten. Vielleicht wird sich da noch ein Ausweg finden. Daß der Konidienträger in diesen Gattungen also eine Zahl von entwicklungsgeschichtlich einander mehr oder minder fernstehenden Formen verbindet, darüber sind wir uns vorweg klar.

Die Gattung *Aspergillus* (Mich.) Corda (inkl. *Eurotium* Link und *Sterigmatocystis* Cramer) hat Konidienträger, die meist starr aufrecht und ungleich derber als die vegetativen Hyphen, 0.2—4 mm hoch (selten darüber), mit endständiger blasiger Anschwellung („Blase"), gewöhnlich unverzweigt und unseptiert, also einzellig, sind. Die Konidienketten entspringen an einfachen oder verzweigten Sterigmen als strahligen oder köpfigen, simultan entstehenden Ausstülpungen der Blase. Schlauchfrüchte sind bislang nur von wenigen Arten bekannt als kleine kugelige, harte Kapseln oder Knöllchen mit zarter einschichtiger oder derber mehrschichtiger Rinde, entweder nackt oder von einer besonderen Hülle umgeben („Blasenhülle"), die achtsporigen Asci sogleich oder nach kurzer Ruheperiode entwickelnd oder auch bislang steril bleibend. Die Entwicklung der Früchte erfolgt aus einer oder zwei besonderen, oder endlich durch Verwachsung zahlreicher gewöhnlicher Hyphen. Die Artenzahl ist unsicher; aufgestellt sind über 100, besser beschrieben kaum 20. Konidienrasen grün, gelb, rötlichbraun, schwarzbraun, weiß.

Die Gattung *Penicillium* Link hat Konidienträger, welche zart und kaum von den gewöhnlichen Hyphen verschieden sind, stets unter einem Millimeter hoch, stiel septiert, vielzellig, gegen die Spitze alternierend oder wirtelig verzweigt, ohne Endblase. Die Konidienketten entstehen auf einfachen, die Zweigenden in der Mehrzahl büschelförmig besetzenden simultan ausgebildeten Sterigmen. Die Schlauchfrüchte, wo bekannt, sind wie bei *Aspergillus* zart oder derb, mit oder ohne Hülle, mit kontinuierlicher Entwicklung oder Ruheperiode oder bislang steril, je nach Spezies, gewöhnlich wohl aus der Verwachsung gleichartiger Hyphen entstehend (*P. glaucum* Brefeld). Die Artenzahl ist unsicher; aufgestellt sind gegen 100, besser beschrieben kaum 12. Die Konidienrasen sind meist grün, seltener andersfarbig (weiß, rötlich, bräunlichgelb, braun).

Die Gattung *Citromyces* Wehmer besitzt zarte Konidienträger wie *Penicillium*, doch unverzweigt, direkt ein Sterigmenbüschel tragend, mit mehr oder weniger entwickelter aspergillusartiger Endblase, sparsam oder nicht septiert. Die Konidienketten sind stets an einfachen, büschelig oder wirtelig beisammenstehenden Sterigmen als succedan entstehenden Ausstülpungen der Blase bez. Stielendung ent-

geordnet. Die Rasen sind grün. Früchte mit Ascusbildung unbekannt. Zwei Arten sind genauer bekannt.

Die Gattung *Allescheria* SACCARDO et SYDOW (= *Eurotiopsis* COSTANTIN) hat sympodial verzweigte Konidienträger, welche Ketten eiförmiger Konidien abschnüren, übrigens auch sonst merklich von denen der vorigen Genera abweichen. Die Schlauchfrüchte sind kugelig (Perithecien) mit achtsporigen Asken. Die Rasen sind weiß bis rötlich oder rot. Bislang ist nur eine (seltenere) Art bekannt.

§ 44. Die Gattung Aspergillus.

Wir fassen hier also alle durch den Besitz des charakteristischen *Aspergillus*-Konidienträgers (mit Sterigmen entwickelnder blasiger Endanschwellung) ausgezeichneten Schimmelformen zusammen und trennen weder *Sterigmatocystis* (mit verzweigten Sterigmen), noch *Eurotium* (mit Perithecienbildung) als besondere Gattungen ab.

Die durch die Form des konidienbildenden Apparats gekennzeichnete Gattung umfaßt eine ansehnliche Zahl nicht immer leicht unterscheidbarer Spezies, für deren Erkennung die Feinheiten in der morphologischen Ausgestaltung jenes Organs eine wichtige Handhabe bieten. Tatsächlich genügen sie allein in vielen Fällen zur Speziescharakterisierung; hierauf, und nicht auf Erörterung der zurzeit noch schwer zu übersehenden Verwandtschaftsverhältnisse, kommt es uns an diesem Orte aber an. Ueber die Gattung *Aspergillus* sehe man auch die Arbeiten von WILHELM (1), SIEBENMANN (1), TIRABOSCHI (1), sowie WEHMER (2) ein; ebenso die neueren sich mit den pathogenen Arten beschäftigenden Publikationen der französischen Forscher, auf S. 210 bei *A. fumigatus* citiert.

Der aus einer senkrecht emporwachsenden, an ihrer Spitze blasig anschwellenden Hyphe hervorgehende, meist unverzweigte und septenlose **Konidienträger**, welcher als gut charakterisiertes Organ in ausgebildetem Zustande die vegetativen Hyphen an Dicke und Wandstärke durchweg merklich übertrifft, läßt gewöhnlieh eine deutliche Sonderung in Stiel und Blase (s. *Fig. 56*) erkennen, allein die letztere ist allseitig oder nur auf der Kuppe von gedrängt stehenden meist außerordentlich zahlreichen Sterigmen wechselnder Länge und Gestalt bedeckt, die entweder direkt oder nach Erzeugung kleinerer sekundärer Sterigmen, an ihrer Spitze kugelige oder ellipsoidische, stets einzellige glatte oder feinkörnige, zartwandige Konidien in langen rosenkranzförmigen Ketten abschnüren, welche als lose zusammenhängende, gewöhnlich farbige Staubmasse das einzelne Köpfchen umgeben, sowie auch der Schimmeldecke ihre spezifische Farbe (grün, schwarzbraun, gelbbraun, gelb u. a.) verleihen. Die kugelige, ovale, keulige oder langkolbenförmige, in ihrer Form nicht gerade immer für die Spezies konstante Blase ist in den zwei letztgenannten Fällen nicht scharf vom Stiel abgesetzt, im übrigen wie dieser gewöhnlich farblos, derbwandig, bisweilen sehr brüchig *(A. minimus)*. Für das mikroskopische Aussehen des präparativ von den Konidien befreiten und aufgehellten Köpfchens ist neben der relativen Länge (bezogen auf die Blase) insonderheit die radiäre *(A. niger)* oder aufwärts gerichtete *(A. fumigatus)* Stellung der Sterigmen von Belang. Die Zahl der eventuell zur Ausbildung kommenden sekundären Sterigmen (oder Sterigmen schlechthin gegenüber der sie tragenden Basidie) schwankt nach der Spezies u. a. zwischen ca. 2 und

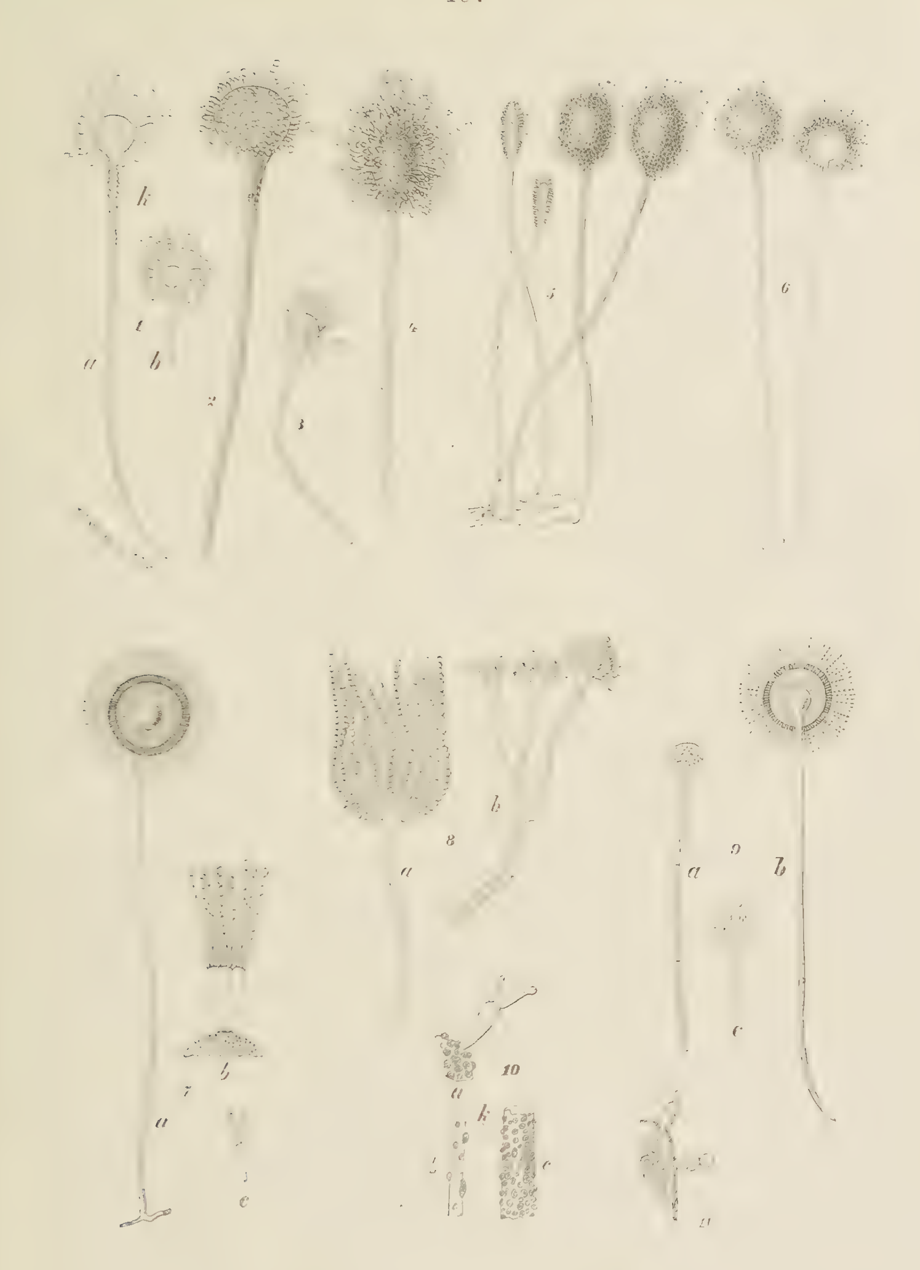


Fig. 56. Aspergillus-Konidienträger.

Köpfchen-, Blasen- und Sterigmen-Form von *A. Ostianus* (1), *A. glaucus* (2), *A. fumigatus* (3), *A. varians* (4), *A. clavatus* (5), *A. Wentii* (6), *A. sulfureus* (7), *A. nidulans* (8), *A. candidus* (9). Körnchenausscheidung von Stiel und Blase bei *A. Ostianus* (10). Alte Sterigmen sowie Blasen von *A. candidus* (9, *a*—*c*). Blasenfragment von *A. giganteus* (hohe und mittlere Einstellung kombiniert): *11.* — Vergr. der Konidienträger überall annähernd dieselbe (ca. 20–30), bis auf *A. fumigatus* (140-fach) u. *A. nidulans* (ca. 80-fach); von *7 b*: ca. 270, von *10 a*: 230, von *11*: 350. — 7 nach Zopf, 8 nach Eidam, das übrige nach Wehmer.

12; durchweg sind sie wesentlich zarter und kürzer als die primären. Konidiengestalt wie Membranbeschaffenheit (glatt oder rauh) kann bei derselben Art wechseln (wohl im wesentlichen Substrat- oder Alterseinfluß), auch ist die Größe selbst bei solchen desselben Köpfchens — wohl die Folge eines auch noch nach der Abschnürung andauernden Wachstums — bisweilen sehr verschieden *(A. Tokelau, A. Oryzae, A. flavus).* In anderen Fällen herrscht in diesen Punkten aber große Regelmäßigkeit *(A. niger, A. clavatus),* so daß mehrfach die Maße direkt zur Diagnose herangezogen werden können. Angesichts der Schwankungen in der Konidienträgergröße, die nicht bloß nach Ernährung und Temperatur sondern auch schon in ein und derselben Kultur recht verschieden ausfallen kann, haben genaue mikroskopische Messungen allerdings nur bedingten Wert; sie sind aber kaum zu umgehen und, verständige Anwendung vorausgesetzt, auch wertvoll. Für die bloße Unterscheidung zwergiger und stattlicher Arten bedarf es deren ja kaum, die ermittelten Maße geben aber dem Gesehenen einen präzisen Ausdruck. Die Tatsache, daß bei einigen Arten *(A. spurius, A. candidus, A. Ostianus)* neben verzweigten auch einfache Sterigmen gefunden wurden — solche somit Mittelformen darstellen —, scheint der Abtrennung einer besonderen Gattung *Sterigmatocystis* nicht gerade günstig.

Fig. 57. Aspergillus-Konidien bei annähernd gleicher Vergrößerung gezeichnet, die Verschiedenheit in Gestalt und Dimension zeigend. *A. glaucus (1), A. fumigatus (2), A. niger (3), A. clavatus (4), A. Tokelau (5), A. varians (6), A. Oryzae (7), A. Wentii (8).* — Vergr. ca. 1000. Origin.

Schlauchfrüchte, als kleine, kugelig-knollige Gebilde (s. *Fig.* 58) von ca. 60—300 μ Durchmesser, sind bislang erst von ca. 5 Arten sicher bekannt (*A. glaucus, A. fumigatus, A. Rehmii, A. nidulans, A. pseudoclavatus*). Voraussichtlich wird sich die Zahl mit der Zeit vergrößern, und man mag dann unter Zugrundelegung dieser die Formen einreihen oder neu gruppieren, bis dahin empfiehlt sich aber, die Abtrennung der Gattung *Eurotium* (*A. glaucus*) besser fallen zu lassen und den Konidienträger als Gattungsmerkmal beizubehalten. In der Mehrzahl der Fälle sind die Ascus-Früchte („Perithecien") zerbrechliche, zartwandige gelbe, dunkelrote oder auch schwarze Kapseln (*A. glaucus, A. pseudoclavatus, A. Rehmii, A. fumigatus*), die bei den zwei letztgenannten in einer besonderen, aus eigenartig veränderten, farbigen, derbwandigen und blasig angeschwollenen Hyphen gebildeten Hülle („Blasenhülle") liegen, bei den zwei ersten dagegen nackt, unbehüllt sind; auch *A. nidulans* zeigt jene Blasenhülle, hier hat der Fruchtkörper aber derbe Beschaffenheit und entwickelt, umschlossen von der mehrschichtigen, dunklen

Rinde, die Asci erst später („Sklerotien"). Ebensolche nackte oder behüllte Sklerotien, die bislang noch nicht zur Sporenbildung zu bringen waren, also steril sind, beobachtete schon WILHELM (1) bei *A. niger*,

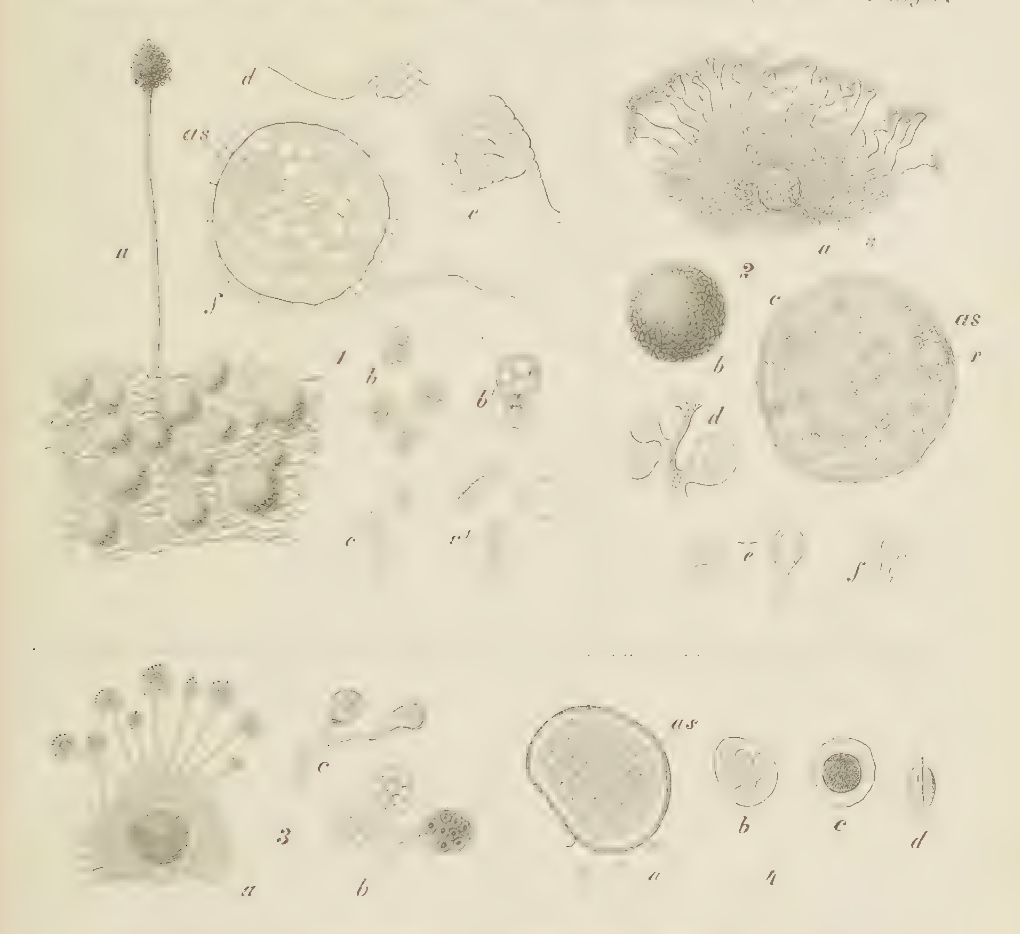


Fig. 58. Schlauchfrüchte vier verschiedener Aspergillus-Arten.

Teilfigur *1*: Perithecien von *A. glaucus*, frei auf dem Substrat liegend *(a)*, daneben Entwickelung des Perithecium aus der „Eurotiumschraube" *(d, e)*, bei *f* ein reifes Perithecium mit jungen Ascis. *b* isolierte Asci, *c'* Sporen reif, *c* desgl. keimend. — *c, b', d, e, f* nach DE BARY, *a, b, c'* nach WEHMER. — Vergr.: s. Fig. 62.

Teilfigur *2*: Sklerotien mit Blasenhülle von *A. nidulans (a)*, freipräpariert *(b)* und Querschnitt, hier Rinde und Asci zeigend *(c)*; *d* junge Asci, *e* Sporen, davon eine mit Keimschlauch, *f* blasig angeschwollene Hyphe der Blasenhülle, mit stark verdickter Wand. — Vergr.: s. Fig. 69. Nach EIDAM.

Teilfigur *3*: Perithecien mit Blasenhülle von *A. Rehmii*, daneben freipräparierte Asci *(b)* und Hyphen der Blasenhülle *(c)*. — Vergr. von *a*: ca. 100, von *b* u. *c*: 1000. Nach ZUKAL.

Teilfigur *4*: Ein aus der Mycelhülle geschältes Perithecium von *A. fumigatus* im Querschnitt *(a)*, darin die Asci *(as)*; bei *b* isolierter Ascus, bei *c* und *d* Sporen mit Hautrand, von oben *(c)* und von der Seite *(d)* gesehen. — Vergr.: s. Fig. 64. Nach GRIJNS.

A. ochraceus und *A. flavus*. Ueber die in der Mehrzahl der Fälle wohl durch Verflechtung und Verwachsung morphologisch gleichwertiger Hyphen eingeleitete Entwicklung, so bei *A. Rehmii*, *A. niger*, *A. ochraceus*, sowie 5

Ascus- und Sporenbeschaffenheit ist die Beschreibung der Spezies weiter unten zu vergleichen. Nur bei *A. glaucus* geht die Entwicklung von einer, bei *A. nidulans* von zwei Fäden aus. Die Ascus-Früchte sind hiernach sehr ungleich, die richtige systematische Bewertung der Unterschiede müßte zur Aufstellung verschiedener Gattungen führen, denn zumal auch Fehlen oder Besitz einer besonderen Hülle ist fraglos ein generisches Merkmal. Es läßt sich dem aber, wie gesagt, heute kaum Rechnung tragen, wenn man nicht zugunsten rein wissenschaftlicher Momente schwerwiegende praktische Gesichtspunkte zunächst ganz preisgeben will.

Nachstehend folgt eine Uebersicht der Aspergillus-Arten, welche Perithecien oder Sklerotien bilden.

Uebersicht der Aspergillus-Arten, welche Perithecien oder Sklerotien bilden:

A. Perithecien (mit sofortiger Ascusbildung):
1. *A. glaucus*
2. *A. pseudoclavatus* } Perithecien nackt, ohne Hülle.
3. *A. fumigatus*
4. *A. Rehmii* } Perithecien mit Blasenhülle.

B. Sklerotien (Ascusbildung nach Ruhepause oder noch unbekannt):
1. *A. nidulans* mit späterer Ascusbildung und Blasenhülle.
2. *A. ochraceus*
3. *A. niger*
4. *A. flavus* } bislang ohne Ascusbildung, ohne oder mit einfacher Mycelhülle.

Eidam nennt übrigens die derbwandigen, ihre Asci allmählich ausbildenden Organe des *A. nidulans* Perithecien, betont aber deren Mittelstellung zwischen den *Eurotium*-Kapseln und den Sklerotien.

Von den zahlreichen, bislang aufgestellten Spezies, deren Zahl gegen 120 beträgt, ist zweifellos eine ganze Reihe zu streichen. Vielfach reicht die Diagnose älterer Autoren nicht halbwegs zur Aufstellung einer neuen Art aus; diese haben in der Regel überhaupt nicht verglichen (was ehemals, vor Erscheinen von Saccardo's Sylloge angesichts der zerstreuten Literatur auch seine Schwierigkeit hatte), sondern gewöhnlich einfach beschrieben. Mehr als ungefähr zwei bis drei Dutzend dürfte man von dem allen heute wohl kaum gelten lassen, ein Umstand, dem leider auch die neueste deutsche Kryptogamenflora nicht voll Rechnung trägt, denn Lindau (1) führt nicht weniger als 55 Spezies und darunter nur 17 zweifelhafte auf. Nur an einem Bruchteil derselben hat dann die technische Mykologie ein Interesse. Immerhin ist diese Pilzgattung vor den meisten anderen deshalb von besonderer Bedeutung, weil sie nicht bloß mehrere gewerblich verwendete Vertreter (*A. Oryzae*, *A. Wentii*, *A. luchuensis*) einschließt, sondern neben chemisch-physiologisch bemerkenswerten (*A. niger*) insbesondere auch mehr oder weniger menschen- und tierpathogene Arten enthält (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*), manche auch in gewerblichen Betrieben, Handelsprodukten, Nahrungsmitteln u. a. gelegentlich auftreten (*A. glaucus*, *A. Phoenicis*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*). Ob auch der pflanzenpathogene Charakter einzelner uneingeschränkt zutrifft, sei dahingestellt; so sollen *A. glaucus* und andere nach Pammel, Weems und Lawson-Scribner (1) Keimlingskrankheiten von Gräsern verursachen, J. Behrens (5) fand aber gerade *A. glaucus* (= *A. medius* Meissner) harmlos, dagegen *A. niger* gefährlich. Jedenfalls gehört, abgesehen von den Saccharomyceten, das Genus *Aspergillus* zu den interessantesten, weil vielseitigsten Pilzgruppen.

Die **Speziesunterscheidung** hat zunächst die Deckenfarbe (aus-

schließlich von jungen Decken!), weiterhin dann insbesondere die Größe und den Aufbau des Konidienträgers, die Gestalt und Größe der Konidien, endlich aber auch physiologische Merkmale, so Ernährungs- und Temperaturansprüche (Optimum), Wachstumsenergie, besondere Wirkungen u. a. zu berücksichtigen. Dabei ist für jeden Fall 5 der eventuelle Einfluß des Substrats (Zucker, Eiweiß, auch Gelatine!) zu beachten. Bislang nicht genügend gewürdigte Unterschiede bestehen auch im Verhalten gegen Gelatine, in der Erzeugung von Farbstoffen im Mycel oder in der Nährlösung u. a. Der Versuch, ältere Vegetationen nach der zumal bei manchen grünen Spezies bald um- 10 schlagenden Konidienfarbe zu identifizieren, ist bedenklich, es sollte da immer die Herstellung einer jungen Kultur voraufgehen; auch andere Merkmale können sich an solch älterem Material verändern. Diesen nicht gebührend gewürdigten Umständen verdanken fraglos nicht wenige der alten „Spezies“ ihr Dasein. 15

Der **Konidienträger** ist in der Mehrzahl der Fälle mit bloßem Auge wahrnehmbar und ca. 1—2 mm hoch (*A. niger*, *A. glaucus*, *A. Oryzae*, *A. clavatus*, *A. candidus* u. a.). Zumal unter günstigen Wachstumsbedingungen kann die Länge bis auf gut das Doppelte steigen (*A. Wentii*, *A. ochraceus* u. a.), im entgegengesetzten Falle aber auch auf einen 20 Bruchteil (0,5—0,25) herabgehen; solch zwergige Träger finden sich fast jederzeit auch bei manchen sonst starkwüchsigen Arten (*A. Oryzae*, *A. candidus*, *A. glaucus*), gewöhnlich dann auch von mehr oder weniger abweichender Form. Nur eine Spezies geht mit ihren hohen, fast mucorähnlichen Konidienrasen weit über das Mittelmaß hinaus, nämlich 25 *A. giganteus*: hier messen die schlanken Träger nicht weniger als 1 bis 2 cm im Mittel. Eine Zahl von Spezies ist durch stets kleine und sehr kleine Konidienträger ausgezeichnet (*A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. minimus*, *A. Rehmii*, *A. spurius*, *A. flavus*), die nur in günstigen Fällen ohne weiteres dem bloßen Auge als solche auffallen, durchweg unter 30 1 mm Länge besitzen, oft aber kaum 0,5 mm erreichen (*A. fumigatus*, *A. minimus*, *A. Rehmii*) und selbst bis auf 0,1 mm herabgehen (*A. fumigatus*), so daß die fast glatte Schimmeldecke hier ganz penicilliumartig erscheint.

Die **Konidiengröße** schwankt als Grenzwert zwischen ca. 3 und 35 10 μ, geht jedenfalls selten darüber hinaus. Bestimmte Arten sind stets kleinsporig („Mikrosporeen“), sie besitzen Konidien von nur ca. 3 μ Durchmesser (*A. nidulans*, *A. minimus*, *A. fumigatus*, oft auch *A. niger*). Das Extrem bilden die großsporigen Spezies („Makrosporeen“) mit wenigstens 5—6 μ großen, oft ungleichen Konidien (*A. glaucus*, *A. flavus*, 40 *A. Oryzae*, *A. Tokelau*), die bei *A. glaucus* und *A. Tokelau* 7—10 μ und darüber (bis 15 μ) erreichen; dazwischen liegen dann die Arten mit ca. 3,5—5 μ im Durchmesser haltenden Konidien (*A. candidus*, *A. clavatus*, *A. Wentii*, *A. giganteus* u. a.), die man zweckmäßig zu den „Mikrosporeen“ zieht und somit bei 5 μ die Grenze setzt. Gegenüber den 45 durch fortgesetzte Abschnürung von der Sterigmen-Spitze succedan gebildeten, bisweilen durch zarte „Zwischenzellen“ verbundenen Konidien entstehen die primären Sterigmen selbst simultan durch Ausstülpung der Blasenoberfläche, und zwar jedenfalls oft bereits vor vollendeter Streckung des Stieles; die die Verbindung herstellende Oeff- 50 nung der Blasenwand ist nur in selteneren Fällen (*A. giganteus*) als feiner Porenkanal mikroskopisch leicht wahrnehmbar (s. *11* in Fig. 56 auf S. 197). Nacheinander aus ihrer Mutterzelle entstehen jedoch die zuerst

von Berkeley (im Jahre 1857) und Cramer (im Jahre 1860) gesehenen sekundären Sterigmen.

Mißbildungen bei vielen Spezies (*A. glaucus, A. Oryzae, A. flavus, A. niger, A. ochraceus, A. fumigatus* u. a.) sind nicht selten und oft be-
5 schrieben worden, so z. B. Auswachsen der Sterigmen zu langgestreckten Schläuchen, vegetativen Hyphen und selbst zu zwergigen Konidienträgern, blasige Anschwellung vegetativer Hyphen, unregelmäßige Verzweigung der Trägerspitze unter Fortfall der Blasenentwicklung, Gabelung des Stiels, abnorme Verzweigung sonst einfacher Sterigmen u. a.;
10 es genügt hier einfache Registrierung der an sich ja unwichtigen Tatsache zwecks richtiger Einschätzung solcher etwa zu Gesicht kommenden Bildungen. Auch die Entstehung von Querwänden im Stiel (*A. flavus* insbesondere) wie in den Sterigmen ist vielleicht hierher zu rechnen; wenigstens erscheint sie ebenso wie auch die mehrfach beob-
15 achtete Verzweigung von Konidienträgern als Bildungsabweichung und als kein konstantes Merkmal, in der Regel ist der Träger eben eine einzellige unverzweigte Hyphe.

Bemerkenswert ist noch, daß eine nicht kleine Zahl der Arten ein hochliegendes Wachstumsoptimum (ca. 35—40°) hat (*A. flavus,*
20 *A. niger, A. Oryzae, A. clavatus, A. fumigatus, A. nidulans, A. Wentii*), dessen man sich gegebenenfalls zur raschen Speziesunterscheidung bedienen kann; unter den bekannteren ziehen nur *A. glaucus* und *A. candidus* niedere Wärmegrade vor, wenn übrigens auch die wärmeliebenden Arten mehrfach noch bei recht niederer Temperatur fortkommen (*A. niger* und
25 *A. Oryzae* z. B. bei unter 10° C).

Es mag hier zunächst eine Uebersicht der Spezies Platz finden; sie beschränkt sich auf besser bekannte oder doch ausführlicher beschriebene bezw. neuere Arten, sieht also von den zahlreichen älteren, oft unkenntlichen ab. Technisch bemerkenswerte sind durch gesperrten Druck her-
30 vorgehoben. Zu beachten bleibt, daß die Deckenfarbe nicht immer etwas Unveränderliches ist, sondern vom Substrat mit abhängt; so können einige grüne Spezies gelb wachsen, weiße gelegentlich gelblich, bei *A. versicolor* Vuillemin schwankt die Farbe sogar zwischen grün und rot. Unter den Arten der Gruppe IV sind fraglos mehrere synonym,
35 auch die weißen (II) und schwarzbraunen (III) bedürfen der Klärung, so daß als halbwegs feststehend schließlich nur die grünen angesehen werden dürfen.

Uebersicht der Aspergillus-Arten nach der Farbe der Konidienrasen, der Sterigmenbeschaffen-
40 heit und dem Vorhandensein von Schlauchfrüchten.

I. Grüne (grau-, bläulich- oder gelblichgrün), und zwar:

a) mit unverzweigten Sterigmen: *A. glaucus* Link mit Ascusfrüchten (nackte Perithecien), *A. clavatus* Desmazières, *A. fumigatus* Fresenius, Ascusfrüchte (Perithecien mit Hülle), *A. Oryzae* (Ahlburg) Cohn, *A. varians*
45 Wehmer, *A. minimus* Wehmer, *A. flavus* Link mit sterilen Sklerotien, *A. giganteus* Wehmer, *A. caesiellus* Saito, *A. Tokelau* Wehmer, *A. Penicillopsis* (Hennings) Raciborski;

b) mit verzweigten Sterigmen: *A. nidulans* Eidam, Ascusfrüchte (Sklerotien mit Hülle), *A. pseudoclavatus* Puriewitsch, Ascusfrüchte (nackte Perithecien),
50 *A. variabilis* Gasperini, *A. versicolor* Vuillemin.

II. Weiße, und zwar:

a) mit verzweigten Sterigmen (bei *A. candidus I* neben einfachen): *A. candidus I* Wehmer, *A. albus* Wilhelm;

b) mit einfachen Sterigmen: *A. candidus* (Link) Saccardo.

III. Schwarzbraune, und zwar:

a) mit verzweigten Sterigmen: *A. niger* (CRAMER) VAN TIEGHEM, mit sterilen Sklerotien. *A. Phoenicis* PAT. et DELACR., *A. Strychni* LINDAU, *A. pulverulenta* MAC ALPINE, *A. atropurpureus* ZIMMERMANN, *A. violaceo-fuscus* GASPERINI;

b) mit unverzweigten Sterigmen: *A. luchuensis* INUI, *A. calyptratus* OUDEMANS.

IV. Braungelbe, gelbe, braune und rötliche, und zwar:

a) mit unverzweigten Sterigmen: *A. Ostianus* WEHMER, *A. Wentii* WEHMER, *A. perniciosus* INUI, *A. giganteo-sulfureus* SAITO, *A. citrisporus* VON HÖHNEL;

b) mit verzweigten Sterigmen (bisweilen neben einfachen): *A. sulfureus* FRESENIUS, *A. ochraceus* WILHELM (mit sterilen Sklerotien), *A. Rehmii* ZUKAL (mit behüllten Perithecien), *A. spurius* SCHRÖTER, *A. elegans* GASPERINI, *A. auricomus* GUÉGUEN (mit sterilen Sklerotien).

§ 45. Aspergillus-Arten mit unverzweigten Sterigmen. (Aspergillus s. str.)

Aspergillus Oryzae (AHLBURG) COHN (= *Eurotium Oryzae* AHLBURG) ist als Verzuckerungspilz praktisch wichtig und in Japan seit Jahrhunderten zur Darstellung der auf Saké (Reiswein, s. S. 204) vergorenen Reismaischen sowie von Soja-Sauce und Miso kultiviert. Zuerst im Jahre 1876 durch AHLBURG (1) als *Eurotium Oryzae* bekannt geworden, und im Jahre 1883 von COHN (1) als *Aspergillus Oryzae* benannt, wurde er später von BÜSGEN (1) untersucht, aber erst im Jahre 1895 von WEHMER (5) morphologisch genauer beschrieben. Die in *Fig. 59* abgebildete Art bildet meist gelblichgrüne (selten gelbe) kräftige Schimmeldecken mit dichtstehenden, ansehnlichen, derben Konidienträgern von ungefähr 2 mm Höhe und ist auf den verschiedensten flüssigen wie festen Substraten unter raschem Wachstum auch bei Zimmertemperatur (Optimum oberhalb 30°) leicht kultivierbar. Späterhin (nach Wochen und Monaten) verfärben sich die Decken gelegentlich ins Braune. Die Merkmale von Konidienträger, Sterigmen und Konidien lassen die Art von den meisten anderen (nur *A. flavus* ist ähnlicher) unschwer unterscheiden. Die in Größe und Form schwankende Blase (keulig bis kugelig) ist in der Regel nicht scharf von dem glatten oder feinkörnigen hellen Stiel abgesetzt. Die



Fig. 59. Aspergillus Oryzae.
1–2: Konidienträger mit keuliger und fast kugliger Blase (*2* im opt. Dschn.). *3–5*: Entwicklung eines kleinen Trägers, Anschwellung der Hyphe, Sterigmenausstülpung und Beginn der Konidienbildung. *1a* derber Stiel im opt. Dschn. *6*: Sterigma, *7*: Konidien-Rasen, schwach vergr., *8*: Konidien. — Annäh. Vergr. von *1–5*: 75, von *6*: 400, von *8*: 900. Nach WEHMER.

Sterigmen sind radiär ausstrahlend oder — so bei kleineren Trägern — mehr auf die Kuppe beschränkt 5 und aufwärts gerichtet, schlank, unverzweigt, große gelblichgrüne kugelige Konidien (6—7 μ dick, glatt oder feinkörnig) in rasch 10 zerfallenden Ketten abschnürend, doch variiert Größe wie Gestalt derselben merklich. Die grünen Köpfchen, bis über 100 μ im 15 Durchmesser haltend, mit bis 80 μ dicker Blase, oft aber viel kleiner, treten in fast jeder Größe auf. Die Sterigmen gut ausgebil- 20 deter Köpfe messen 12—20 zu 4—5 μ, somit erheblich von den gedrungenen kurzen Sterigmen von *A. glaucus* abweichend. Ascusfrüchte 25 wie Sklerotien sind bislang unbekannt, ebenso Sproßzellbildung (angebliche „Hefe" der Sakébrauerei), die wiederholt behauptet 30 aber nie auch nur halbwegs exakt bewiesen worden ist. Mißbildungen der Träger (Gabelung des Stieles, Auswachsen der Sterigmen zu 35 Fäden oder zarten Konidienträgern, auch Verzweigung) sind nicht selten. Die Art erzeugt eine sehr wirksame Diastase (vergl. § 51); sie 40 ist als Malzersatz auch im Abendlande empfohlen und technisch versucht worden; auf die ersten diesbezüglichen Angaben Kor- 45 schelt's (1) im Jahre 1876 folgte eine ganze Zahl chemisch-physiologischer Arbeiten bez. technischer Mitteilungen über diese uralte 50 Kulturpflanze Japans; vgl. die Zusammenstellung bei Wehmer (2). Die Konidien bleiben zufolge Wehmer (12)

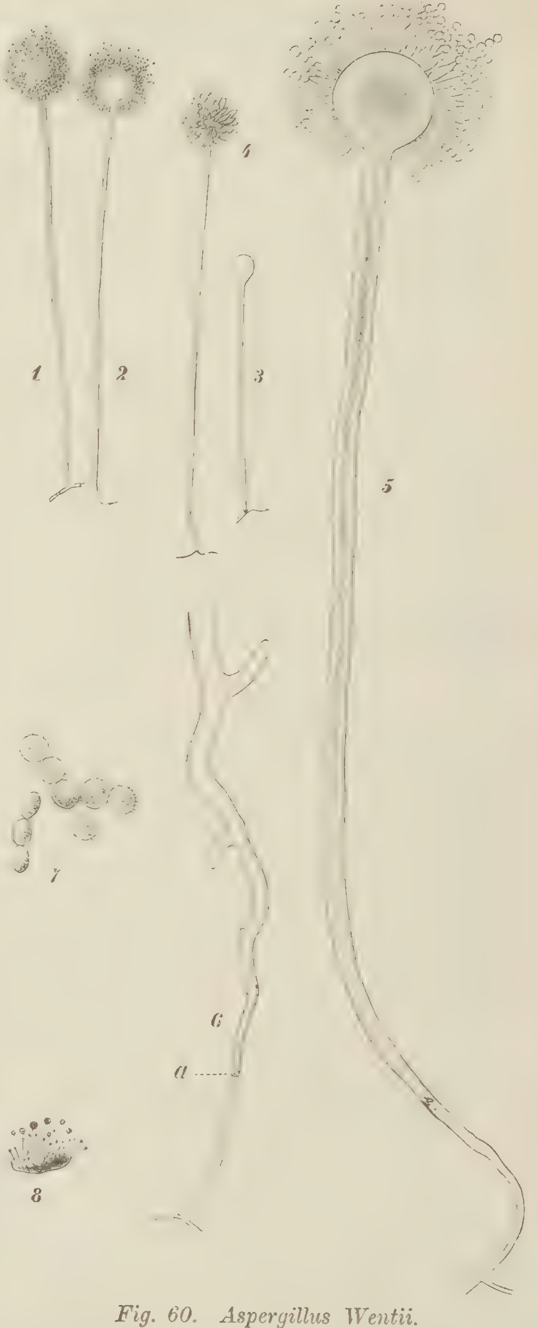


Fig. 60. Aspergillus Wentii.
Konidienträger (*1—5*), *2* u. *5* im opt. Durchschn. Fig. *3—5* Entwicklung der Blase *(3)* und Sterigmen *(4)*, bei *5* beginnt soeben die Konidienabschnürung. *6*: Basis eines Trägers mit seitlichen Ausstülpungen. Konidien *(7)*, junger Rasen *(8)*. — Ungef. Vergr. von *1—4*: 20, von *5* u. *6*: 120, von *7*: 900. Nach Wehmer.

jahrelang keimfähig; von Einfluß ist dabei nach Hiller (1) das Substrat, auf dem der Pilz gewachsen ist, so daß gewisse Nährböden günstig (Würze), andere dagegen ungünstig sein sollen (Dextrose). Nähere morphologische Angaben findet man bei Cohn (1), Büsgen (1), Wehmer (2 u. 5).

Aspergillus Wentii Wehmer wurde von Went bei der in Java üblichen Sojadarstellung beobachtet und im Jahre 1896 von Wehmer (4) beschrieben. Auf den gekochten, mit *Hibiscus*-Blättern bedeckten Sojabohnen spontan auftretend, bewirkt er eine Lockerung und Aufschließung des festen Bohnengewebes (vergl. § 57). Die Art bildet (s. *Fig. 60*) hellkaffeebraune, dichte Schimmeldecken mit ansehnlichen, ungefähr 2—3 mm hohen Konidienträgern, deren dicker, brauner Kopf (bis 200 μ im Durchm.) auf hellem schlanken, derbwandigen, glatten Stiel deutlich hervortritt; sie ist mit keiner anderen zu verwechseln. Die streng kugelige, vom Stiel scharf abgesetzte Blase (75—90 μ im Durchm.) ist allseitig mit dicht gedrängten, radiär ausstrahlenden, stets unverzweigten, schlanken Sterigmen (meist 15 zu 4 μ) besetzt, welche in langen Ketten die farbigen, kugeligen bis schwach gestreckten, fein punktierten oder glatten, ziemlich kleinen Konidien (ca. 4,5 μ im Durchm.) abschnüren. Das schneeige, bisweilen auch rötlich verfärbte, in alten Kulturen bis rotbraune Mycel wächst in geschlossenen Kulturgefäßen gern hoch in den Luftraum empor, auch hier reichlich Konidienträger erzeugend; s. *Fig. 61*. Perithecien oder Sklerotien sind bislang nicht bekannt. Die leicht auf den üblichen mykologischen Substraten zu kultivierende, rasch wachsende Art gedeiht besonders gut im Brutschrank (oberhalb 30⁰).



Fig. 61. Luftmycel mit Konidienträgern von *Aspergillus Wentii* hoch in einem Kulturkolben emporwachsend. — Ca. nat. Gr. Nach Wehmer.

Ueber die bei der Bohnenzersetzung wirksamen Enzyme ist Näheres nicht bekannt. Gleich der vorher besprochenen Art gehört sie der europäischen Pilzflora wohl nicht an, wenn schon beide auch bei uns gut ihr Auskommen finden.

Aspergillus glaucus Link (= *Eurotium Aspergillus glaucus* A. de Bary) ist die gemeine, überall verbreitete, insbesondere auf getrockneten Pflanzen, altem Schwarzbrot (Pumpernickel), Rinden, süßen eingemachten Früchten, altem Lederwerk, Heringslake und anderen Materialien als

grüner Schimmel auftretende altbekannte Art, die in der Literatur unter sehr verschiedenen Namen (*Eurotium herbariorum* LINK, *Aspergillus herbariorum*, *Eurotium Aspergillus glaucus* DE BARY, *Eurotium glaucum*; auch *E. repens* scheint nichts anderes) geht, seitdem von A. DE BARY (1) im Jahre 1859 die Zusammengehörigkeit der von ihm (2) als solche erwiesenen Ascusfrucht (des früheren *Eurotium herbariorum*) und der Konidienträgerform (dem *Aspergillus glaucus* LINK) zu ein und demselben Pilz gezeigt worden war. Die jungen Konidienrasen sind freudig hellgrün bis grünspanfarben, dunkeln aber rasch und werden schon nach kurzem schmutzig graugrün bis graubraun: gleichzeitig färbt sich das Mycel durch Ausscheidung reichlicher Farbstoffkörnchen zunächst



Fig. 62. Aspergillus glaucus.
Konidienträger *(1, 2)*, Sterigmen *(3)* und Konidien *(4)*. In Fig. *5* ein Stück der Myceldecke mit den aufliegenden Perithecien und einem Konidienträger, mäßig vergrößert; bei *6* in ungef. nat. Größe. Fig. *7* Perithecienquerschnitt mit jungen Ascis *(as)* und ersten Entwicklungsstadien („Eurotiumschraube"); isolierte Asci *(8)* und freiliegende Sporen *(9)*, bei *c* keimend. — Ungef. Vergr. von *1—2*: 50, von *5*: 30, von *7*: 170, von *8*: 250, von *9 c*: 700. *1, 7, 8, 9* (z. T.) nach DE BARY, übriges nach WEHMER.

hellgelb, weiterhin aber schmutzig rostbraun, so daß ältere Vegetationen oft gänzlich verfärbt und unansehnlich sind und erst Neuaussaat eine Identifizierung des Pilzes erlaubt. Zu seiner richtigen Bestimmung ist also von Kulturversuchen auszugehen, die Merkmale alter Vegetationen sind unbrauchbar; manche der verschiedenen früheren *Aspergillus*-Spezies, die auf solches Material hin aufgestellt wurden, sind voraussichtlich nur alte Vegetationen von *A. glaucus* und einfach zu streichen, anstatt sie in den alten Akten der Systematiker aufzubewahren. Bisweilen findet man nur konidienbildende Rasen, in anderen Fällen wieder ausschließlich und massenhaft goldgelbe Perithecien tragende Decken (so gelegentlich auf süßen eingemachten Früchten, z. B. auf

Preißelbeeren). Der in *Fig. 62* abgebildete Konidienträger (1—2 mm hoch) ist unschwer von denjenigen anderer Arten zu unterscheiden: Blase, Sterigmen wie Konidien bieten charakteristische Merkmale. Erstere ist nicht scharf vom Stiel abgesetzt, kugelig bis kolbig, ca. 60 μ im Durchmesser haltend, mit unverzweigten, sehr kurzen, gedrungenen Sterigmen (bis 14 zu 7 μ) allseitig dicht besetzt, welche ungemein große feinstachelige Konidien (7—10 μ im Durchm. und darüber) von kugeliger oder schwach gestreckter Form abgliedern. Letztere sind also im Vergleich zu den Sterigmen auffällig groß (ca. die Hälfte der Sterigmenlänge im Durchmesser), und diese selbst sehr plump, (halb so dick wie lang), nicht schlank und spitz wie bei vielen anderen Arten. *A. glaucus* besitzt unter allen besser bekannten Arten die größten Konidien. Keine andere Art erzeugt auch so leicht und in so großer Menge Schlauchfrüchte (Perithecien) als kleine, ca. 100—200 μ im Durchmesser haltende, erst hellcitrongelbe, später unansehnlich braune Kapseln mit zarter einschichtiger Wand, zahlreiche kugelig-ovale Asci einschließend. Jeder Ascus enthält 5—8 farblose, glatte, ellipsoidische Sporen mit Längsfurche, 7—10 μ lang, 5—8 μ breit, die, unter Sprengung der Wand das Exospor zweiklappig abwerfend, zu neuem Mycel auskeimen. Auf die allmähliche Entwicklung der Perithecien aus einer schraubig gewundenen Hyphe soll hier nur kurz hingewiesen werden, der Vorgang ist in fast allen botanischen Büchern sattsam behandelt; er verläuft sowohl im Lichte wie im dunklen Raum, wird also — gleichwie die Konidienbildung bei *A. niger* u. a. — nicht, wie Elfving (1) glaubt, durch das Licht unterdrückt. Auch die von diesem Forscher angegebene Hefenbildung ist sehr problematisch und unbewiesen. Reichliche Verzweigungen der Konidienträger soll man nach Lendner (1) experimentell durch Zusatz von Antisepticis oder Nährstoffmangel hervorrufen können.

Bezüglich seiner Substrate ist der im Gewerbe wie im Haushalt mehrfach auftretende Pilz wählerisch, indem er z. B. auf flüssigem zuckerhaltigem Nährboden mit Mineralsalzen und anorganischer Stickstoffnahrung schlecht fortkommt; günstig ist dagegen Schwarzbrot oder als gutes, bakteriologisches Substrat Würzegelatine. Auch liebt er niedere Temperaturen (noch bei 8—10° gedeihend) und kommt nicht mehr bei Blutwärme zur Entwicklung, so daß das gelegentlich angegebene Auftreten im menschlichen Ohr — noch neuerdings wieder von Hatch und Row (1) — wohl auf Verwechslung mit *A. fumigatus* oder *A. flavus* beruht. Nach Nomura (1) soll er neben *A. flavus* an der als Cocoon Fungus („Uchikabi") bekannten, für die Seidenkultur verderblichen und zuerst durch Raux (1) auf *Aspergillus*-Arten zurückgeführten Krankheit beteiligt sein. Sicher ist er ein Hauptschimmelerreger für Schwarzbrot, auch tritt er nach J. Behrens (1) häufig als schädlicher Bewohner dachreifen Tabaks sowie von Zigarren (s. Bd. V, S. 5 u. 16), ebenso auf Hopfen auf, bewirkt auch zufolge Spieckermann und Bremer (1) das Verschimmeln von Baumwollensaatmehl, vielleicht gehört diese Art mit zu den bislang nicht näher bestimmten Leder schädigenden *Aspergillus*-Arten (s. Bd. V, S. 34). In sauren Gurkenbrühen fand sie Aderhold (1), auch auf geräucherten Fleischwaren (Schinken) kommt sie gut fort und bevorzugt überhaupt ausgesprochen wasserarme Substrate. Ob sie für bestimmte Fälle tatsächlich pflanzenpathogen auftreten kann und z. B. an dem Verderben und Schwarzwerden der Maronen mitbeteiligt ist, wie das Roze (1) will, bliebe

noch näher zu untersuchen. Gelegentlich findet man sie in Wall- und Haselnüssen (von der Schale umschlossen auf dem Kern) reichlich Perithecien bildend. Ihre Temperaturgrenzen sind 7—37 ° C; das Optimum liegt nach KLEBS (1) bei 27—29 °, nach anderen liegt das Optimum bei 20—25 °, das Maximum bei 30 ° (ELFVING, SIEBENMANN). Nähere morphologische Angaben findet man bei A. DE BARY (1), WILHELM (1), SIEBENMANN (1), R. MEISSNER (2), WEHMER (2).

Die als *Eurotium repens* DE BARY und *E. Aspergillus medius* MEISSNER (2) bezeichneten Pilze sind von *A. glaucus* vermutlich nicht verschieden, da greifbare Unterschiede, die das Maß der überhaupt vorkommenden Schwankungen überschreiten, kaum zu sehen sind. Indes wäre ein genauerer Verfolg dieses Punktes zur endlichen Beseitigung der vorhandenen Unsicherheit sehr erwünscht. Ob das beim Schimmeln von Baumwollensaatmehl (vgl. 21. Kap. d. II. Bds.) gefundene *Eurotium rubrum* SPIECKERMANN et BREMER (1) etwas anderes ist, scheint gleichfalls fraglich und erst nach einer bislang noch ausstehenden erschöpfenden Beschreibung zu entscheiden.

Aspergillus flavus LINK ist in Deckenfarbe (gelblichgrün) und Gestalt der Konidienträger dem *A. Oryzae* sehr ähnlich, durch die kleineren Maße der letzteren (unter 1 mm hoch) jedoch schon deutlich verschieden. Diese für Tiere erklärt pathogene Art mit hochliegendem Wachstumsoptimum (gegen 37 °), die auch mehrfach bei Mykosen im menschlichen Ohr gefunden (Ohrenpilz der Mediziner) und hier gelegentlich für *A. glaucus* ausgegeben worden ist, kommt sonst auf Brot, Pflanzenteilen, trockenen Exkrementen vor und gedeiht zumal bei Blutwärme auf allen möglichen mykologischen Substraten üppig unter rascher Entwicklung umfangreicher gelblichgrüner Schimmeldecken. Rein gelb ist die Deckenfarbe nur ausnahmsweise; ältere (Wochen bis Monate alte) Decken verfärben sich auch hier leicht, werden schließlich unansehnlich dunkelbraun. Die gewöhnlich unter 1 mm messenden (0,5—0,7 mm) Konidienträger (s. *Fig. 63*) mit kugeliger bis keuliger, selten scharf vom hellen, warzigen Stiele abgesetzter Blase zeigen unverzweigte schlanke Sterigmen, die allseitig radiär ausstrahlen oder mehr auf die Kuppe beschränkt sind und große (im Mittel 5—6 μ im Durchm. haltende), meist unregelmäßig-kugelige, glatte, seltener feinkörnige Konidien in leicht und bald zerfallenden Ketten abschnüren. Die farbigen Köpfchen



Fig. 63. *Aspergillus flavus.* Konidienträger mit kugliger bis keuliger Blase und unverzweigten Sterigmen (*1*—*4*), die Außenwand des oft septierten Stieles durch farblose Körnchen rauh (*5*). *7*: Konidien. *6*: Konidienrasen (ca. $^2/_1$). — Vergr. von *1*—*4*: 140, von *5*: 400, von *7*: 500. Nach WEHMER.

messen bis ca. 90 μ, die Blase 30—40 μ im Durchmesser, die Sterigmen gewöhnlich ca. 20 zu 6 μ; übrigens schwankt der Konidiendurchmesser zwischen 4—8 μ, die Art gehört aber jedenfalls (neben *A. glaucus* und *A. Oryzae*) zu den großsporigen. Perithecien sind bislang nicht bekannt, doch wurden im Jahre 1877 von WILHELM (1) kleine, schwarze, knollige Sklerotien (ca. 0.7 mm im Durchmesser haltend) mit dicker Rinde und hellerem Mark beschrieben, die bei Keimversuchen steril blieben; sie entstehen anscheinend durch einfache Verflechtung und Verwachsung morphologisch gleichwertiger Fadenelemente. Nähere morphologische Angaben findet man bei WILHELM (1), SIEBENMANN (1), WEHMER (2).

Bei der als Cocoon Fungus bezeichneten schon genannten Puppenkrankheit der Seidenraupen ist dieser Pilz nach NOMURA (1) der Hauptschädling, sonst spielt er gewerblich keine Rolle; untergeordnet neben anderen Pilzen kommt er gelegentlich auf verschimmeltem Baumwollsaatmehl vor. In der Literatur geht er mehrfach und mit Unrecht als *A. flavescens* WRED., einer zu streichenden Art (synonym), auch DE BARY's Benennung als *Eurotium A. flavus* ist angesichts der fehlenden Perithecien unbegründet. Der heute noch in der Literatur vorkommende *A. subfuscus* JOHAN-OLSEN (1) ist nach allem wohl nur ein verkannter *A. flavus*.

Aspergillus fumigatus FRESENIUS, diese gemeine kosmopolitische, durch hohes Temperaturoptimum (gegen 40°) und schnelles Wachstum ausgezeichnete, rein- bis graugrüne Art (nicht gelblichgrün!), ist mehr von medizinischem Interesse (pathogen), tritt aber gelegentlich auch im Gewerbe, zumal bei Prozessen, die sich bei höheren Temperaturen abspielen, störend hervor, so bei gewissen Gärungen (Milchsäuregärung z. B.), nach BEHRENS auf Rippen fermentierender Tabaksblätter (s. Bd. V, S. 9); in einem Falle ist sie durch WEHMER (1) auch als massenhaft auftretender Fleckenbildner auf Wollwaren (vergl. Bd. III, S. 290) nachgewiesen worden. Zumal im Brutschrank findet der Pilz sich gern auf allerlei Vegetabilien (faulenden Kartoffeln, Brot, Malz, Bierwürze u. a.) ein, hat nach F. COHN (2) auch thermogene Wirkung (vergl. 24. Kap. d. I. Bds.). Wichtiger ist sein nicht seltenes Vorkommen in Höhlungen des menschlichen und tierischen Körpers (Ohr des Menschen, Lunge verschiedener Vogelarten), hier Oto- und Pneumomykosen veranlassend, letztere nach RÉNON (1) bei Arbeitern bestimmter Gewerbe (Taubenfütterer und Haarkämmer in Paris) fast regelmäßig anzutreffen. In die Blutbahn von Versuchstieren gebrachte Konidien keimen im Körper aus und bewirken schwere, meist tödlich verlaufende Erkrankung. Aufgefunden wurde die Art zuerst von FRESENIUS (1) im Jahre 1841 in Bronchien und Lufthöhlen einer Trappe. Ihre normalen Konidienrasen sind jedoch nicht — wie der Speziesname andeuten soll — rauchgrau, sondern penicilliumgrün, verfärben sich allerdings bald in grau und bis schmutzig braun. Leicht kenntlich ist sie an den zwergigen (0,1—0,3 mm hohen) Konidienträgern (s. *Fig. 64*) mit keuliger Blase (10—20 μ dick) und kuppenständigen, aufwärts gerichteten, schlanken (6—15 μ langen), einfachen Sterigmen und langen Ketten sehr kleiner (2—3 μ im Durchmesser haltender) meist kugeliger Konidien, so daß die Art, unbeschadet der etwa existierenden Rassen, kaum mit einer anderen zu verwechseln ist. Nachdem J. BEHRENS (2) bereits früher Perithecien und SIEBENMANN (1) Sklerotien beobachtet zu haben glaubten, sind wir erst neuerdings durch GRIJNS (1) über die wirkliche Ascusfrucht unterrichtet. Nach diesem sind es haselnußfarbige, kleine, kugelige,

250—350 μ im Durchmesser haltende, mit besonderer Hülle versehene Gebilde, aus denen das eigentliche, dunkelrote Perithecium mit sehr zerbrechlicher, mehrschichtiger, farbiger Wand unschwer herauszuschälen ist. Sein Inhalt besteht aus einem farblosen Fadenfilz, in dem zahlreiche farblose eiförmige (14 zu 9 μ), dünnwandige Asci eingebettet liegen, die je 8 linsenförmige rotgefärbte, derbwandige Sporen (4 zu 4,5 μ) umschließen, um deren Aequator sich ein radiär gestreifter heller Anhang zieht. Seiten- und Vorderansicht der erst kurz vor der Reife sich färbenden Sporen sind also merklich verschieden. Grijns hat diese durch ihre Hülle an die von *A. nidulans* (Eidam) erinnernden Schlauchfrüchte in größerer Zahl auf den Decken und in zahlreichen abgeleiteten Kulturen gefunden. Uebrigens glaubt Vuillemin (1) auf Grund der Aehnlichkeit dieser Ascosporen mit denen des *A. nidulans*, daß Grijns diese Art vorgelegen hat, was indes wohl kaum anzunehmen ist. Nähere morphologische Angaben findet man bei Fresenius (1), Siebenmann (1), Behrens (1), Wehmer (2), Grijns (1). Mit *A. fumigatus* scheinen *A. nigrescens* Rob. sowie *A. bronchialis* Blumentritt (1) synonym zu sein. — Nach einer neuesten Mitteilung konstatierte Blumentritt (2) allerdings das Vorliegen kleiner Abweichungen der Kulturen von *A. bronchialis*, ebenso wollen Costantin und Lucet (2) den Stamm *A. fumigatus* in eine Mehrzahl von Formen zerlegen, teilweise unterschieden durch ihr pathogenes Verhalten; sie beschreiben auch als hierhergehörige neue Spezies *A. Lignieresi* und *A. virido-griseus*. Ueber Rassen des *A. fumigatus* und pathogene Arten überhaupt vergleiche man ferner Savoff (1), Savouré (1), Bodin (1), Guéguen (3), Macé (1).



Fig. 64. Aspergillus fumigatus.
1–2: keulige Konidienträger (bei *1* im opt. Dschn.), *3*: Konidien, *4*: Ascus und Ascosporen, *5*: eigenartig blasig angeschwollene Hyphen (*bl*) neben Konidienträgern aus einer Decke. — Ungef. Vergr. von *1*, *2*, *5*: 140, von *3*: 1000, von *4a*: 70, *4b*: 719, von *4c* u. *4d*: 2250. *4a—d* nach Grijns, übriges nach Wehmer.

Aspergillus luchuensis Inui. Dieser kürzlich beschriebene dunkelfarbige Schimmel, welcher nach Inui (1) bei der auf den Luchu-Inseln gebräuchlichen Darstellung des „Awamori" (eines dem Whisky ähnlichen Getränks) eine ähnliche Rolle spielt wie der Reisaspergillus bei der Sakébereitung, ähnelt morphologisch dem *A. Wentii*, in der Farbe dagegen anscheinend dem *A. niger*. Die 40—80 μ dicken Köpfchen der 1—2 mm hohen Konidienträger (s. *Fig. 65*) sind schwarzbraun, ihre kugelige, seltener kolbige Blase von 20—30 μ Durchmesser ist mit dichtstehenden, radial ausstrahlenden, 6 zu 3 μ messenden, kegeligen Sterigmen bedeckt, deren 4—5 μ dicke, kugelige Konidien feinwarzig sind. Peri-

thecien sind bislang nicht gefunden worden. Das Wachstumsoptimum des stärkeverzuckernden und in dieser Hinsicht noch näher zu untersuchenden Pilzes, der, von Farbe und den etwas geringeren Dimensionen abgesehen, dem *A. Wentii* außerordentlich ähnelt, liegt bei 30—35°.



Fig. 65. Aspergillus luchuensis. Konidienträger und Konidien. — Ungef. Vergr. von *1*: 300, von *2*: 1000. Nach INUI.



Fig. 66. Aspergillus Tokelau. Konidienträger verschiedener Größe von der Haut eines erkrankten Menschen. Ungef. Vergr. 300. Nach WEHMER.

Neben ihm fand INUI (1) im Awamori-Koji eine andere, morphologisch ganz ähnliche, aber graubraune Art (*A. perniciosus*), die nur als Verunreinigung anzusehen ist, in gutem Material also zurücktritt oder ganz fehlt. 5

Aspergillus Tokelau WEHMER, von TRIBONDEAU (1) bei der als „Tokelau“ oder Samoa disease bekannten ansteckenden Krankheit der Eingeborenen gewisser Inselgruppen des Stillen Ozeans gefunden und zunächst als „Lepidophyton“ bezeichnet, ist mehr von medizinischem Interesse, aber als Bewohner der menschlichen Haut bemerkenswert. Ob die Art in weiterem Umfange bei dieser bislang als Trichophytie angesehenen Erkrankung mitwirkt, bleibt noch festzustellen, jedenfalls ist der Pilz eine echte *Aspergillus*-Art, und zwar zufolge WEHMER (3) eine gut charakterisierte neue Spezies, ausgezeichnet durch *A. glaucus*-ähnliche große (bis 12 μ im Durchmesser haltende) feinstachelige Konidien (s. *Fig. 66*), die an Trägern entstehen, welche bald denen des *A. glaucus*, bald mehr denjenigen des *A. fumigatus* ähnlich sind. 10 15 20

Aspergillus clavatus DESMAZIÈRES, auf Vegetabilien, nach P. LINDNER (1) speziell auch auf Malz (s. Bd. V, S. 259) öfter vorkommend, hier rein grüne Schimmelrasen (nicht gelblichgrün!) bildend, ist sonst ohne praktische Bedeutung. Durch die eigenartige langgestreckte

(kanonenwischerähnliche) Blase (150 zu 35 μ), wie sie auch bei *A. pseudoclavatus* (mit verzweigten Sterigmen) und *A. giganteus* vorkommt, ist diese Art auffällig und schon von DESMAZIÈRES (1) im Jahre 1834 beobachtet worden.

5 Die kurzen (ca. 8 zu 3 μ) einfachen Sterigmen (s. *Fig. 67*) schnüren kleine, ovale (nicht 10 kugelige!), glatte Konidien (4,2 zu 2,8 μ) in langen Ketten ab, welche die länglichen Köpf- 15 chen als graugrüne Staubmasse einhüllen. Die Länge der 15—25 μ dicken Konidienträger- 20 stiele beträgt bis ca. 2 mm, selten darüber.

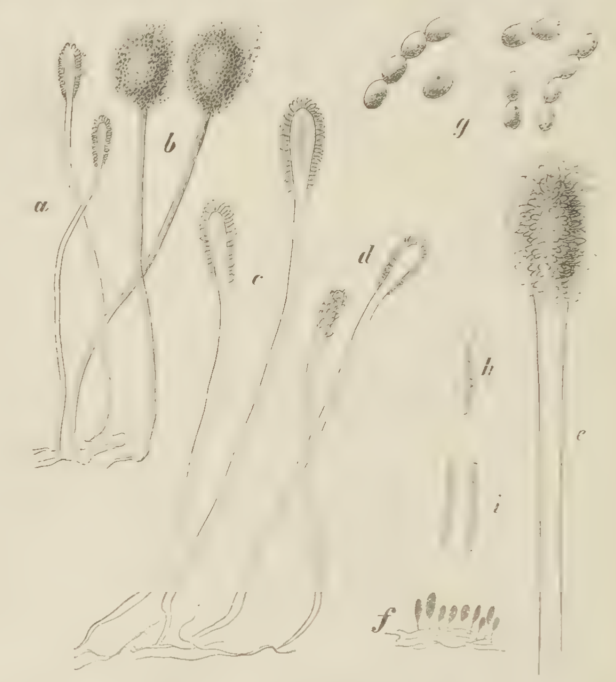


Fig. 67. Aspergillus clavatus.
Konidienträger in verschiedenen Entwicklungsstadien mit langkeuliger Blase und einfachen Sterigmen, bei *c* im opt. Dschn., bei *e* Beginn der Konidienbildung. *f* schwach vergrößerter Rasen. Konidien (*g*), Sterigma (*h*), Stieldurchschnitt (*i*). — Annäh. Vergr. von *a* u. *b*: 30, von *c* u. *d*: 60, von *e*: 120, von *g* u. *h*: 1000. Nach WEHMER.

Als auf Pflanzen vorkommend wer- 25 den in der Literatur noch genannt: der stattliche, grüngelbe *A. Penicillopsis* (HENNINGS) 30 RACIBORSKI (1), sowie der zwergige, olivfarbene *A. Delacroixii* (DELACROIX) SACCARDO et SYDOW, 35 in Cacaobohnen von DELACROIX beobachtet, beide noch eingehenderer Untersuchung bedürfend. An sonstigen besser bekannten Arten seien hier nur genannt: die grünen *A. varians* WEHMER und *A. minimus* WEHMER, auf Blättern bezw. Zuckerlösungen beobachtet, und *A. Ostianus* WEHMER (auf 40 Blättern, gekochtem Reis), letzterer durch hell ockerbraunen Farbstoff charakterisiert. Ihnen schließt sich eine große Zahl mehr oder minder gut beschriebener, vorzugsweise auf Vegetabilien beobachteter, meist noch nicht in Kultur gezogener Spezies an (darunter die neueren *A. calyptratus* und *A. Koningi* OUDEMANS [2], *A. citrisporus* F. VON 45 HÖHNEL [1]). Als Riese seinesgleichen sei aus diesem Grunde noch

Aspergillus giganteus WEHMER (2) erwähnt. Die in der Blasen- und Sterigmen-Gestalt ganz denen des *A. clavatus* ähnlichen Konidienträger des auf saurer Würze vorkommenden Pilzes erreichen durchschnittlich eine Länge von 1—2 cm, somit ca. das Zehnfache der meisten anderen 50 Arten. Vor beginnender Färbung des Köpfchens erscheint der Rasen mucorähnlich, erst später sticht er durch die graugrüne Farbe der auf schlanken, hell safrangelben Stielen stehenden Konidienköpfe (1000 zu 120—250 μ) deutlich gegen die graugelblichen bis dunklen *Mucor-*

Vegetationen ab. Die kurzen, stets unverzweigten Sterigmen (9—12 zu 4—5 μ), die Oberfläche der Blase (500—800 zu 80—100 μ) dicht bedeckend, erzeugen verhältnismäßig kleine, ovale, glatte Konidien (im Mittel 4 zu 2.6 μ). Auf den üblichen Substraten bei Zimmertemperatur wächst er üppig und ist leicht kultivierbar. Bemerkenswert ist die hier ohne Mühe zu beobachtende deutliche Durchbrechung der Blasenwand unterhalb der Sterigmen, welche im Durchschnitt als feiner Kanal, in der Aufsicht als kleiner Kreis innerhalb des größeren dem Sterigmenquerschnitt entsprechenden hervortritt, so daß hier die Blase mit feinen konzentrischen Kreisen bedeckt erscheint (s. *11* in Fig. 56 auf S. 197). Ascusfrüchte sind bislang nicht beobachtet.

§ 46. Aspergillus-Arten mit verzweigten Sterigmen[1]) (Sectio Sterigmatocystis).

Aspergillus niger van Tieghem = *Sterigmatocystis antacustica* Cramer = *Sterigmatocystis nigra*. Diese bekannte, allverbreitete und zumal in chemisch-physiologischer Beziehung oft studierte Art, über die schon eine ganze Literatur vorliegt, ist kenntlich an dem braunschwarzen Konidienrasen mit ansehnlichen, einige Millimeter hohen, starren, schlanken Konidienträgern: jedenfalls bedarf jeder gleichgefärbte *Aspergillus* der Literatur, sofern er unter anderem Namen auftritt, eines besonderen Legitimitäts-Nachweises. Artbezeichnungen wie z. B. *A. nigricans* Wreden aus dem Jahre 1869, *A. nigrescens* Robin aus dem Jahre 1851, wie auch *A. nigricans* Cooke sollten ganz verschwinden, indes mehr als ein halbes Dutzend anderer mindestens eine recht zweifelhafte Existenzberechtigung haben. Der rechtmäßige Speziesname ist beiläufig *Sterigmatocystis antacustica* und zwar nach der Benennung Cramer's (1), der den von ihm im menschlichen Gehörgang aufgefundenen Pilz im Jahre 1859 zuerst genau beschrieb: der später (1867) von van Tieghem (1) *A. niger* genannte Pilz stimmt, wie schon Wilhelm (1) feststellte, durch den Besitz verzweigter Sterigmen mit ihm überein. Die morphologische Untersuchung des Konidienträgerbaues (s. *Fig. 68*), welche Entfernung bezw. Entfärbung der dunklen Konidienmassen verlangt, zeigt auf hellem starren ca. 15 μ dicken Stiel eine scharf abgesetzte kugelige Blase (ca. 80 μ im Durchm.), radial ausstrahlende, schlanke primäre Sterigmen (26 zu 4.5 μ) mit je 3—4 zierlichen sekundären (8 zu 3 μ), und lange Ketten kleiner (ca. 3—4 μ im Durchm.), kugeliger, glatter bis warziger Konidien als Träger der dunklen Farbe. Uebrigens stimmen die Zahlen der verschiedenen Autoren nicht immer sehr überein, so findet man als Konidiengröße mehrfach 3.4—4.5 μ, als Sterigmenlänge auch 20—100 μ, was mit Rücksicht auf die Diagnosen der weiter unten erwähnten schwarzen Arten ausdrücklich hervorgehoben sei; natürlich gibt es große und kleine Köpfe, und schließlich kommt es immer darauf an, was man mißt, wenn man eben nicht den Durchschnitt zugrunde legt. Unter ungünstigen Verhältnissen, so bei ungeeigneten Nährböden, verkümmert der Konidienträger (Sterigmen wenig zahlreich, auch unverzweigt, Konidien bleich etc.), wie früher schon von Duclaux (1) und neuerdings

[1]) Die Trennung ist keine scharfe, bei einigen Arten kommen neben verzweigten auch einfache Sterigmen vor.

auch von Molliard und Coupin (1) sowie von Lutz (1) berichtet wurde. Unter Umständen soll nach C. Engelke (1) eine Konidienform, ähnlich der von *Botrytis*, das *Sceptromyces Opizii* Corda zur Ausbildung kommen; diese nicht sehr wahrscheinliche Angabe bedürfte jedenfalls eines strengeren Nachweises an unbedingten Reinkulturen.

Sklerotien des Pilzes sind wiederholt — zuerst wohl von K. Wilhelm (1) im Jahre 1877 — beobachtet worden, doch immer ohne Ascusentwicklung. Sie entstehen nach Brefeld (1) durch einfache Verflechtung und Verwachsung morphologisch gleichwertiger Hyphen und stellen 1—3 mm im Durchmesser haltende, gelbliche, harte, derbwandige Knöllchen von fast Kugelgestalt dar; sie liegen zerstreut auf — oder nach Wilhelm (1) auch innerhalb — der Decke, sind übrigens im ganzen selten, so daß man sie mehr ausnahmsweise findet. Die praktische Bedeutung des leicht zu kultivierenden, wärmeliebenden, doch auch noch wenige Grade über 0° langsam gedeihenden Pilzes (Optimum gegen 40°, Minimum ca. 7°), der mit Vorliebe auf bestimmten sauer reagierenden Substraten auftritt (Galläpfelextrakt, Gerbsäurelösungen, Lösungen der Fruchtsäuren mit Zucker und sonstigen Nährstoffen versetzt) und so zufolge Wehmer (10) unschwer eingefangen werden kann, ist unerheblich; um so wichtiger ist er als Versuchspilz für Bearbeitung pilzphysiologischer Fragen geworden. Technisch wirkt er mit bei der Darstellung von Gallussäure aus Tannin sowie von Opium (vergl. § 53). Den Medizinern ist er als nicht seltener Bewohner des Gehörganges (Ohrenpilz) bei Otomykosen bekannt, doch scheint sein Auftreten hier sekundär zu sein. Auch die Beteiligung an der Flachsröte ist wohl zweifelhaft. Nach Bordas (1) verursacht er die in Frankreich als piqûre oder tache jaune bezeichnete Krankheit des Korkes mancher Korkeichen, welche die Bäume immer nur an der Wetterseite ergreift; solcher Kork liefert dann Stopfen mit „Pfropfengeschmack“, die dann auch den *Aspergillus* rein oder gemischt mit anderen Schimmelpilzen enthalten. Nicht selten scheint er nach J. Behrens (5) bei Keimkraftprüfungen von Sämereien störend einzugreifen; Infektionsversuche hatten ein Verkümmern der Keimlinge zahlreicher Spezies zur Folge, so daß



Fig. 68. Aspergillus niger. *1* u. *2*: Konidienträger, bei *2* opt. Durchschn. nach Entfärbung und Aufhellung die kuglige Blase und den doppelten Strahlenkranz der verzweigten Sterigmen sowie Konidienzone zeigend (halbschematisch). *3* u. *4*: junge Träger vor und bei beginnender Sterigmenbildung (opt. Durchschn.). *5*: kuglige warzige Konidien. *6*: freipräparierte Sterigmen. *7*: Sklerotien, nach resultatlosem Keimversuch (bei *b* zerfallen). *8*: derbwandige getüpfelte Zellen des zerfallenen Sklerotien-Innern. *9*: Konidienrasen. — Ungef. Vergr. von *1—4*: ca. 40, von *5*: 1000, von *6*: ca. 154, von *7*: nat. Gr., von *9*: ca. 2. Nach Wehmer.

der Pilz unter diesen Umständen wohl pathogenen Charakter annimmt. Auf die vielseitigen chemischen Wirkungen, darunter auch das ganz ausgesprochene Oxalsäure-Bildungsvermögen ist im 11. Kapitel näher einzugehen. Daß dem angeblich eisenhaltigen schwarzen Pigment (dem Aspergillin, s. Bd. I, S. 289), für das Leben des Pilzes irgend welche physiologische Bedeutung zukommt, wie das Linossier (1) will, ist angesichts der Natur desselben als Ausscheidungsprodukt der Konidien wohl nicht gut anzunehmen, wenn auch nach Molisch (1) und neuerdings Kanter (1) Eisen ein für den Pilz unentbehrlicher Stoff sein soll; größeres Interesse scheint das von Milburn (1) verfolgte gelbe Pigment der Hyphen zu beanspruchen. Auf eine ganze Reihe neuerer physiologischer Arbeiten von Czapek (1), R. Chodat und Bach (1), Raciborski (1), Lode (1), Ono (1), Hattori (1), Kny (1), Bourquelot und Hérissey (1), Saida (1), Iwanoff (1), Kosinski (1), Richter (1), Emmerling (1), Lutz (1), Friedel (1), Maximow (1), Kostytschew (1), Koernicke (1), Kanter (1), Heinze (1), Jousset (1), Orlowski (1), Molliard und Coupin (1), Kurzwelly (1), Kosjatschenko (1), Lesage (1), Pantanelli (1), Altenburg (1), Charpentier (1), Krasnosselsky (1), E. Meissner (1), Porodko (1), R. Meissner (1), Todur (1), Garnier (1), Coupin (1), die sich mit der chemischen Zusammensetzung, der Ernährung, Atmung, Enzymbildung, Einfluß von Reizmitteln, Radiumstrahlen, Konidienresistenz gegen schädigende Einflüsse u. a. beschäftigen, sei hier kurz hingewiesen; die bis zum Jahre 1901 vorliegende frühere Literatur über diesen vielgenannten Pilz ist bereits in nicht weniger als 79 Nummern bei Wehmer (2) zusammengestellt. Ueber die zahlreichen Enzyme desselben ist das folgende Kapitel einzusehen.

Von Pilzen, die dem *A. niger* ähnlich sind, wird gelegentlich das Innere gewisser Früchte bewohnt. So fand schon Corda in Datteln den von ihm als *Ustilago Phoenicis* bezeichneten, von Patouillard und Delacroix (2) als *Sterigmatocystis*-Art erkannten *Aspergillus Phoenicis*, und Hennings (1) erkannte den von Reichardt (1) in getrockneten Feigen angetroffenen und als *Ustilago Ficuum* beschriebenen Pilz gleichfalls als *Sterigmatocystis* (*St. Ficuum*). Nach G. von Lagerheim (1) sind aber auf Grund neuerer Nachprüfung beide Pilze identisch. Es fragt sich nun noch, ob dieser, bislang nicht in Reinkultur mit *A. niger* verglichene Dattel- und Feigenpilz wirklich von letztgenanntem verschieden ist, das scheint noch keineswegs zweifellos; immerhin sei er als die genannten Früchte verderbend („Feigenbrand“) hier kurz beschrieben. Die das Innere der Feigenfrucht dicht mit einer schwarzen Konidienmasse ausfüllenden Konidienträger mit 75—100 μ dickem Köpfchen besitzen nach Hennings (1) eine kugelige, 45—60 μ im Durchmesser haltende Blase, besetzt mit dichtstehenden, keuligen Primärsterigmen (15—28 zu 6—9 μ); die in der Mehrzahl vorhandenen, schlanken, dunklen sekundären Sterigmen (5—8 zu 2—3 μ) erzeugen in langen Ketten zahlreiche kugelige, schwarzviolette, meist 4 μ dicke Konidien, welche nach Hennings glatt, nach G. von Lagerheim (1) jedoch mit körnigen Leisten versehen sind. Nach letzterem entstehen auch Sklerotien. Der Pilz bildet Oxalsäure, verzuckert Stärke und invertiert Rohrzucker, was wir alles auch bei *A. niger* finden; ebenso verhält sich der dunkle Farbstoff der Konidien ganz ähnlich. Die von ihm erzeugte Dattelkrankheit („Mchattel“) kommt im Niltal öfter vor; der Genuß pilzkranker („brandiger“) Feigen erregt nach Hennings Verdauungsstörungen. Seine Heimat ist Aegypten, Tunis (in Datteln und Feigen).

Eine ähnliche Art ist neuerdings (1904) von LINDAU (1) als *A. Strychni* beschrieben worden. Sie erfüllt die zu mumienartigen harten Massen eingetrockneten Früchte von *Strychnis leiosepala* in Angola vollständig mit schwarzem Konidienpulver. Die starren, 2—4 mm hohen
5 Konidienträger tragen ein schwarzes 250—330 μ dickes Köpfchen mit dunkler, kugeliger Blase von 58—66 μ im Durchmesser. Die primären Sterigmen (mit Querwand) maßen bis 100 μ in der Länge (85 μ im Mittel) bei 7—20 μ Dicke, die sekundären 10—11 μ bei bis ca. 3,5 μ Dicke. Auch hier ist der Durchmesser der kugeligen, feinstacheligen,
10 dunklen Konidien ca. 4 μ. Köpfchen- und Sterigmen-Dimensionen sind zwar weit erheblicher, doch wäre der Pilz jedenfalls vergleichend mit *A. niger* zu kultivieren.

MAC ALPINE (1) beschrieb bereits im Jahre 1896 einen auf allen Teilen von *Phaseolus vulgaris L.* gefundenen, schwarzen *Aspergillus* (*Sterig-*
15 *matocystis pulverulenta*) mit kugeligen, dunklen, feinwarzigen Konidien von 4 μ Durchmesser, mit dem der LINDAU's auch hinsichtlich der Dimensionen große Aehnlichkeit hat. Kulturversuche mit allen diesen Arten sind zwecks Festlegung der gegenseitigen Beziehungen jedenfalls sehr angezeigt, wir müssen notwendig wissen, wie sich Maß und Formen
20 solcher Pilze unter kontrollierbaren Bedingungen stellen.

Der als *Aspergillus Welwitschiae* (BRESADOLA) P. HENNINGS, von BRESADOLA früher als *Ustilago W.* bezeichnete, auf alten Früchten von *Welwitschia mirabilis* gefundene Pilz ist jedenfalls, wie auch HENNINGS (laut gelegentlicher brieflicher Mitteilung) schon erkannte, ein gewöhn-
25 licher *A. niger*. Aehnliches mag für den im Fruchtknoten von *Phyllanthus Emblica* (in Ostindien) von BECK gefundenen *A. Ustilago* und manchen anderen gelten. Damit ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß tatsächlich noch andere, sehr ähnliche braunschwarze Sterigmatocysten existieren, siehe z. B. P. LINDNER (1), wo zwei derartige unbenannte Formen kurz
30 erwähnt werden, wie denn auch der von A. ZIMMERMANN (1) auf faulenden Kaffeefrüchten in Buitenzorg gefundene, sonst ähnliche *A. atropurpureus* durch große, 6—8 μ im Durchmesser haltende Konidien abweicht. Bislang scheinen wenigstens die Konidien des *A. niger* nicht an den Größenschwankungen ihrer Träger teilzunehmen.

35 Formen, die sonst ganz mit *A. niger* übereinstimmen, auf Grund langsamerer und seltener Konidienbildung als besondere Spezies („kleine Arten") zu beschreiben, wie das von COSTANTIN und LUCET (1) geschieht (*Sterigmatocystis pseudo-nigra*), dürfte aber kaum motiviert sein, auch zu manchen Unklarheiten führen. Auf Gallen, Apfelsinen, Tannin- wie
40 Citronensäurelösung fand GASPERINI (1) endlich eine als *A. violaceo-fuscus* bezeichnete Art, deren eiförmige Konidien 3,3—5 zu 5—6,5 μ maßen, indes andere Merkmale, zumal auch das Vorkommen, sehr an *A. niger* erinnern.

Aspergillus candidus I WEHMER (2) tritt mit Vorliebe auf alten ver-
45 dorbenen Vegetabilien verschiedenster Art (verschimmeltem Pumpernickel, verfaulten Gurken, ebensolchen Trauben am Stock, verdorbener Kohlbrühe, verschimmeltem Baumwollensaatmehl, desgl. Getreide), faulem Harn, altem Käse u. a. auf; auch das meist träge Wachstum der Kulturen auf den üblichen Substraten deutet an, daß seine Ernährungs-
50 ansprüche etwas eigenartige sind, anscheinend bevorzugt er alkalische Reaktion des Nährbodens. Uebrigens haben wir voraussichtlich mehrere der in der Literatur beschriebenen weißen Spezies zu dieser einen zusammenzuziehen; ob es die alte Art LINK's ist, vermag man kaum an-

zugeben. Die ganz schneeweißen, in alten Kulturen ins gelbliche verfärbten (cremefarben) und selbst bräunlichen Decken (so bei alten Würzekulturen) zeigen zweierlei Konidienträger, und zwar sowohl solche, die in ihrem Aufbau ganz denen von *A. niger* entsprechen (mit kugeliger Blase und verzweigten Sterigmen, s. *9* in Fig. 56) wie auch einfacher gebaute (mit unverzweigten Sterigmen), wesentlich kleinere. Die Konidien sind meist ellipsoidisch, glatt oder fein punktiert, 2.5—4 μ groß. Der von Wilhelm (1) im Jahre 1877 beschriebene *A. albus* mit kugeliger Blase und verzweigten Sterigmen, von welchem der durch P. Lindner (1) auf verdorbener Gerste fast regelmäßig gefundene Pilz allerdings verschieden erscheint, entspricht vielleicht der größeren Form. Eine kritische Durcharbeitung der weißen Arten an der Hand von Kulturen ist sehr erwünscht; zurzeit ist diese Gruppe noch — sofern man sich nicht einfach an lückenhaften Beschreibungen und fertigen Speziesnamen genügen läßt — ein wenig übersehbares Chaos. Man vergleiche dazu nur die bei Wehmer (2) sowie Lindau (2) zusammengestellten Formen.

Aspergillus nidulans (= *Sterigmatocystis nidulans* Eidam). Diese bei Injektion in das Blut pathogene (Optimum bei ca. 40° C!), gelegentlich auch im menschlichen Ohr beobachtete, im Jahre 1883 von Eidam (1) auf einem Hummelnest gefundene zierliche grüne Species, die übrigens ziemlich selten zu sein scheint, ist durch ihre Ascusfrucht (Sklerotien) von Interesse; bislang ist diese allerdings erst in einem Falle gefunden und studiert worden, später konnte Eidam sie nicht wiedererhalten. Ganz neuerdings (1904) hatte aber Saito (1) dieselbe unter Händen,



Fig. 69. Aspergillus nidulans.
Konidienträger mit verzweigten Sterigmen (*1* u. *2*), Konidien (*4*), Schlauchfrucht mit Blasenhülle (*3*), bei *6* freipräpariert, bei *7* im Durchschnitt, Rinde und Asci (*8*) zeigend, Sporen (*9*), deren eine mit Keimschlauch. Vergr. von *1* u. *2*: 330, von *3*: 120, von *4*: 1000, von *6*: 85, von *7*: 170, von *8*: 400. Nach Eidam.

ohne sie freilich näher zu verfolgen, nach diesem findet sich in Japan der Pilz neben *A. glaucus* ziemlich häufig unter den Luftkeimen. Die derbwandigen Konidienträger (s. *Fig. 69*) der grünen, später verfärbten Decken messen bis 0.6—0.8 mm, sind aber häufig nur $^1/_3$ bis $^1/_2$ so lang; die verzweigten Sterigmen der wenig hervortretenden, an *A. fumigatus* erinnernden, keuligen (15—20 μ dicken) Blase bedecken gewöhnlich nur deren obere Hälfte und erzeugen meist kugelrunde, glatte oder feinpunktierte, sehr kleine Konidien (3 μ im Durchmesser) in langen,

zu derben Massen zusammenhaftenden Ketten. Septenbildung, auch Verzweigung der Stiele, bisweilen in sehr unregelmäßiger Weise, scheint nicht selten zu sein. Nach den von EIDAM angestellten Ermittlungen über Entwicklung der Ascusfrucht entsteht diese nicht wie bei *A. glaucus* aus einer, sondern aus zwei Hyphen als erster Anlage, von denen die eine sich zu der mehrschichtigen, pseudoparenchymatischen, derben Rinde entwickelt, indes die andere das die Asci bildende Füllgewebe liefert. Mehrere Wochen vergehen bis zur vollständigen Ausbildung und Reife der dann mit einer derben, dunkelschwarzroten Wand versehenen Schlauchfrucht. Die eiförmigen, allmählich entstehenden Asci von 10—11 μ Länge umschließen je 8 linsenförmige, glatte Sporen (ca. 5 zu 4 μ) mit Längsrinne und derbem, purpurfarbigem Epispor, das bei der Keimung in zwei Hälften zersprengt wird. Aehnlich wie bei *A. fumigatus* und *A. Rehmii* sind die 0,2—0,3 im Durchmesser haltenden Sklerotien von einer Hülle eigenartiger, blasig angeschwollener, gelblicher Hyphen umgeben (bei *A. glaucus* und *A. pseudoclavatus* fehlt eine solche „Blasenhülle"). — Kurz erwähnt sei nur der von VUILLEMIN (1) als *Sterigmatocystis* benannte *A. pseudo-nidulans* (VUILL.), gleichfalls mit Ascosporen.

A. Rehmii ZUKAL und *A. pseudoclavatus* PURIEWITSCH sind ebenfalls Arten mit verzweigten Sterigmen, beide anscheinend seltener und ohne praktische Bedeutung, doch bemerkenswert als einige der wenigen, von denen Ascusfrüchte angegeben sind; diese selbst sind freilich ganz verschieden von denen des *A. nidulans.*

Aspergillus Rehmii (s. 3 in Fig. 58) ist von ZUKAL (1) im Jahre 1893 auf Galläpfeln und verdorbener Eichenrinde gefunden worden. Die schwefel- bis ockergelben Decken entwickeln zwergige Konidienträger (0.4—0.5 mm hoch) mit länglich-eiförmiger Blase (20 zu 30 μ), schlanken Sterigmen und kugeligen bis ellipsoidischen kleinen Konidien (2.5—4 μ groß). Die schwarzen, brüchigen Perithecien (0.1—0,2 mm) mit einschichtiger, aus sehr regelmäßig gestellten Zellreihen bestehender Rinde sind von einer dichten Hülle aus gelben, oft blasig angeschwollenen Hyphen umgeben; ihre gleichzeitig entstehenden, kurzgestielten, eiförmigen, bald verschleimenden Asci bilden alsbald je 8 dunkel rauchgraue, elliptische, derbwandige Sporen (5 zu 3.5 μ) aus. Hier entstehen die Fruchtkörper durch Verflechtung und Verwachsung morphologisch gleichwertiger Hyphen. Die Art dürfte wohl als kritisch gelten.

Aspergillus pseudoclavatus PURIEWITSCH stimmt im Bau der Konidienträger bis auf die verzweigten Sterigmen ganz mit dem von *A. clavatus* überein, seine Blase mißt ca. 260—300 zu 60—70 μ; auch die ellipsoidischen, graugrünen Konidien messen 3,5—4 zu 2,5—3 μ, sind also denen dieser Art gleichgestaltet und gleichgroß. In den kugeligen, kleinen, 60—70 μ dicken, unbehüllten Perithecien mit einschichtiger Wand liegen nur wenige (6—7) ovale Asci mit je 8 farblosen Sporen; anscheinend geht die Perithecien-Anlage aus zwei Hyphen hervor. Die von PURIEWITSCH (2) im Jahre 1899 auf alten Hefenkulturen gefundene Art hat ihr Wachstumsoptimum bei ca. 25°.

Von sonstigen besser bekannten Sterigmatocysten seien hier nur aufgeführt: die braungelben *A. sulfureus* FRESENIUS (auf Rinden), *A. ochraceus* WILHELM (auf Brot und feucht liegenden Pflanzenteilen) mit reichlicher Sklerotienbildung, doch ohne Ascus-Entwicklung, der grüne *A. elegans* GASPERINI (auf faulenden Citronen), *A. variabilis* GASPERINI (auf faulenden Früchten) mit einfachen neben verzweigten Sterigmen. Ihnen schließen sich zahlreiche, vorzugsweise auf Vegetabilien gefundene,

mehr oder weniger zweifelhafte oder doch unzureichend beschriebene an, die man in SACCARDO's (2) Sylloge zusammengestellt, auch bei WEHMER (2) kritisch gesichtet findet. Der von WILHELM (1) beschriebene und eingehend studierte *A. ochraceus* bildet reichlich knollige, braune, nicht zur Ascus-Entwicklung gelangende Sklerotien, die durch Verflechtung und Verwachsung gewöhnlicher Hyphen — also wie bei *A. niger* — entstehen. Mit ihm scheint der *A. auricomus* von GUÉGUEN (1) identisch zu sein. Neuerdings ist von VUILLEMIN und MIRSKY (1) ein *A. versicolor* (*Sterigmatocystis v.*) sowie von GUÉGUEN (3) ein *A. syncephalis* beschrieben worden. *A. versicolor* ist wegen der wechselnden Farbe seiner Kulturen von Interesse und neuerdings wiederholt von MIRSKY (1), VUILLEMIN (2), FRIEDEL (2), COUPIN und FRIEDEL (1) studiert worden. Die Konidienträger gleichen denen des *A. niger*, das Wachstumsoptimum liegt jedoch weit niedriger, bei 37—39° findet überhaupt keine Entwicklung mehr statt. Das Mycel ist rostbraun. Sklerotien oder Perithecien werden nicht gebildet. Das rote alkohollösliche Pigment entsteht nur in den grünen Kulturen. Der Pilz tritt außer in grünem Rasen auch in einer rötlichen Form (mit rosa Konidien) auf, die aber später oder früher in grün zurückschlägt. Morphologische Einzelheiten scheinen über die Art noch nicht mitgeteilt zu sein.

Als Spezies, die wohl nur Synonyme, jedenfalls auf Grund unvollständiger Beschreibung nicht kenntlich sind, aber noch in der neueren Literatur umgehen, sind *A. luteus* (v. TIEGH.), *A. flavescens* WRED. (ist *A. flavus* LINK), *A. nigricans* WRED. (auch COOKE), *A. nigrescens* ROB. (beide wohl *A. niger*), *A. terricola* MARCH. (vielleicht *A. flavus*?), *A. griseus* LINK (*A. fumigatus*?), *Eurotium malignum* LINDT (ist wohl *A. fumigatus* FRES.?), *A. Quininae* HEIM, *A. subfuscus* JOHAN-OLSEN (= *A. flavus*?) zu nennen. Die Berechtigung zur Verwendung dieser Namen kann jedenfalls nur bei gleichzeitiger, den Pilz kenntlich machender Beschreibung zugestanden werden, andernfalls weiß der Leser nicht, um was es sich handelt. Auch die wissenschaftliche Literatur bedient sich leider nicht immer korrekter Namen. So kennt z. B. GREEN (1) den längst notorischen *Aspergillus Oryzae* nur als „*Eurotium oryzae*".

§ 47. Die Gattung Penicillium.

Die wissenschaftlich wie praktisch zwar gegen *Aspergillus* minder wichtige, aber immerhin noch erhebliches Interesse beanspruchende, durch den *Penicillium*-Konidienträger charakterisierte Formengruppe umfaßt eine Zahl einander mehr oder minder ähnlicher, praktisch im wesentlichen als Schimmelerreger von Vegetabilien, Käsebewohner und Fäulnispilze reifer Früchte in Frage kommender Spezies.

Der in seiner morphologischen Ausgestaltung auf einer merklich niederen Stufe als der von *Aspergillus* stehende mikroskopisch kleine, zarte Konidienträger unterscheidet sich nur durch die Art der Verzweigung und leidlich aufrechten Wuchs von einer gewöhnlichen, vegetativen Hyphe: er ist nicht merklich dicker und ebenso zartwandig, auch septiert wie diese. Die in Wirteln oder Büscheln succedan entstehenden, schlanken Sterigmen besetzen die nicht blasig angeschwollenen, annähernd bis zu gleicher Höhe sich erhebenden, meist senkrecht emporwachsenden Enden von Haupt- und Seitenzweigen. Von letzteren sind gewöhnlich zwei bis vier vorhanden, bald alternierend,

bald wirtelig angeordnet; im einzelnen ist der Aufbau selbst bei Trägern derselben Spezies aber merklichen Schwankungen unterworfen. Aus dieser Verzweigungsart resultiert die ausgesprochen pinselförmige Gestalt des Trägers („Pinselschimmel"). Die Zahl der nach aufwärts meist deutlich 5 divergierenden Sterigmen bewegt sich zwischen 2 und 10. ihre relative Länge (auf das Köpfchen bezogen) wie Spitzenform wechselt je nach Art, ist bei derselben Spezies aber ziemlich konstant. Die kugeligen oder ellipsoidischen, meist glatten, zartwandigen, einzeln fast farblosen,

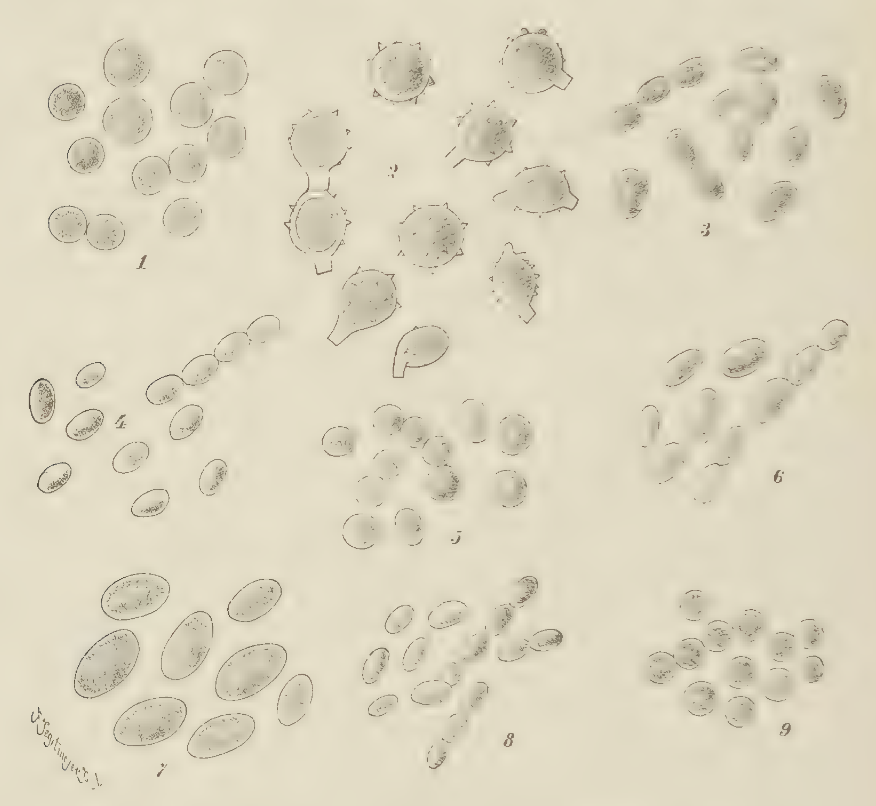


Fig. 70. Konidien verschiedener Penicillium-Arten, bei gleicher Vergrößerung (ca. 1200) gezeichnet.

1: P. Camembert (Konidiengröße: 3,1—4,5 μ Durchm.). *2: P. brevicaule* (7—10 zu 5,7—6,8 μ messend). *3: P. purpurogenum* (2,8—3,3 zu 2 μ messend). *4: P. clavariforme* (3 zu 2 μ). *5: P. rubrum* (2,8—3,5 μ im Durchm.). *6: P. italicum* (4—5 zu 2—3 μ). *7: P. olivaceum* (6—10 zu 4—6 μ). *8: P. luteum* (2,3—3 zu 1,4—2 μ). *9: P. glaucum* (2,5—3 μ im Durchm.).

Messungen an Material aus Reinkulturen auf Würzegelatine. Origin.

in Masse aber den Schimmeldecken die charakteristische Farbe gebenden 10 Konidien der gewöhnlicheren Spezies („*P. glaucum*", *P. luteum*, *P. italicum*) sind meist klein — ca. 2.5—5 μ größter Durchmesser — können aber in einzelnen Fällen bis auf 10 μ Länge (*P. olivaceum*) auswachsen. Die jüngeren Glieder der langen Ketten sind oft merklich kleiner, auch gestaltlich etwas abweichend und durchweg in festerem Verbande, 15 Lockerung unter beträchtlicher Größenzunahme tritt erst allmählich ein.

Die schon von E. LOEW (1) verfolgte Keimung von *Penicillium*-Konidien bietet kaum Besonderheiten.

Mehrere Arten sind durch Neigung zur Coremium-Bildung (s. Bd. I, S. 194) ausgezeichnet, bei einigen tritt dieselbe unregelmäßig, anscheinend abhängig von den Umständen (*P. luteum*, *P. glaucum*), bei 5 anderen wieder sehr regelmäßig und fast unter allen Umständen auf (*P. granulatum*, *P. claviforme*). Die bäumchenartigen Coremien von *P. luteum* fallen durch Größe (bis 1 cm hoch) und zierlichen Wuchs auf, diejenigen von dem durch BAINIER (1) beschriebenen *P. claviforme* weichen insofern von den übrigen ab, als hier zierliche isariaartige, 10 anfangs schneeweiße Keulen, deren Kopf sich später unter Ergrünen mit den Konidienträgern bedeckt, gebildet werden. Dieser Pilz, bei dem die Deckenoberfläche steril bleibt und Konidien nur auf dem bis über 1 cm langen keuligen Stroma (s. Bd. I, S. 212) entstehen, wäre überhaupt wohl zu *Isaria* zu stellen. 15

Schlauchfrüchte als kleine, kugelig-knollige, farbige Gebilde sehr verschiedenen Charakters sind bislang von ca. 4—5 Spezies genauer bekannt. Weichrindig mit kontinuierlicher Entwicklung sind sie bei *P. luteum*, *P. aureum*, *P. insigne* (?), die Rinde ist pseudoparenchymatisch bei den zwei letzten, bei der ersten besteht sie aus ziemlich locker ver- 20 webten, später verklebenden Hyphen. Nach längerer Ruheperiode (diskontinuierliche Entwicklung) zur Ascusbildung übergehende derbe Sklerotien bildet das *P. glaucum* BREFELD, ebensolche jedoch sterilbleibende findet man bei *P. italicum*. Die Perithecien des dem *P. luteum* offenbar sehr nahestehenden *P. aureum* besitzen außerdem nach VAN 25 TIEGHEM's (2) Angabe eine gelbe Mycelhülle. Auch von *P. candidum* LINK sind Perithecien von MORINI (1) angegeben, über die Konidienform ist jedoch vom Autor nichts Näheres mitgeteilt worden; da Abbildungen fehlen, müssen wir die Frage hier offen lassen. Aehnliches gilt von *P. Wortmanni* KLÖCKER (s. S. 234). Genauere Angaben über die Ent- 30 wicklungsgeschichte sind spärlich, widersprechen einander auch mehrfach. Die Ascosporen sind ellipsoidisch mit derbem, glattem (*P. aureum*), warzigem (*P. insigne*, *P. Wortmanni*) oder leistenförmig verdicktem (*P. glaucum* BREF., *P. luteum* ZUK.) Epispor, mit (*P. glaucum* BREF.) oder ohne Längsfurche (*P. luteum* ZUK.). 35

Die **Speziesunterscheidung** hat, solange Ascusfrüchte von einer größeren Zahl von Arten nicht bekannt sind, die Deckenfarbe (bei den meisten Spezies grün in verschiedenen Nuancen von bläulich- bis braungrün, doch kommen auch gelbliche, weiße und braune Arten vor), die Konidienträger-Verzweigung sowie die Größe und Form 40 der Konidien, neben sonstigen feineren, insbesondere aber auch physiologische Merkmale, wie Pigmentbildung, Wachstumsenergie, Gelatineverflüssigung, Säurebildung, Ernährungsansprüche an die verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen u. a. zu berücksichtigen. Ueber die Wärmeansprüche war (mit Ausnahme der Kollektivspezies „*P. glaucum*") 45 bis vor kurzem noch wenig bekannt, bei Blutwärme besser gedeihende Arten sind noch nicht angegeben, fast durchweg scheint das Maximum unter 37° zu liegen. Ganz neuerdings sind von STOLL (1) für sechs morphologisch und kulturell näher studierte Arten einige bezügliche Beobachtungen mitgeteilt worden, wonach nur *P. purpurogenum* und 50 *P. rubrum* ein höheres Wachstumsoptimum (30°, bezw. 30—35°) haben, das der übrigen jedoch unter 30° liegt, so das von *P. italicum* bei 25°, von *P. olivaceum* bei 23—25°, von „*P. glaucum*" und *P. brevicaule* bei

20—23°. Die Färbung alter, zudem unter unkontrollierbaren Bedingungen gewachsenen Rasen ist für Unterscheidungszwecke selbstverständlich unbrauchbar; graue, braune und dunkelfarbige Spezies der älteren Literatur mögen solchen mehrfach ihr Dasein verdanken. Für die Farbennuance ist hier gleichwie bei *Aspergillus* mehrfach der Substratcharakter mit entscheidend, zumal scheint alkalische Beschaffenheit die Verfärbung des Grün in grau-bräunliche Töne zu begünstigen.

Die **Zahl** der als Käsereifungspilze, Schimmel- und Fäulniserreger von Früchten praktisch in Frage kommenden Arten beläuft sich bei dem augenblicklichen, im ganzen wenig erfreulichen Stande unserer Kenntnis der *Penicillium*-Arten auf ca. 6—7, denen sich später wohl noch einige weitere zugesellen werden. Gegenüber *Aspergillus* ist bislang das Fehlen tierpathogener sowie außereuropäischer technischer Spezies bemerkenswert; wenigstens sind einige wenige als Bewohner von Schleimhäuten und tierischem Substrat angegebene pathognostisch bislang wohl sehr zweifelhaft und als distinkte Spezies überhaupt kritisch (*P. quadrifidum* Salisbury, *P. pruriosum* Salisb. u. a.), hier bleibt späterer Forschung noch ein weites Feld. Ein von Siebenmann (1) im Ohr eines Kranken gefundenes *P. minimum* bedarf noch näherer Aufklärung. In einer vorläufigen Mitteilung stellte neuerdings F. Dierkx (1), unter fast völliger Ignorierung der bisherigen, nicht weniger als 22 neue Arten auf, für welche aber weder ausreichende Diagnosen noch Abbildungen bislang publiziert sind; da auch Standorte der gefundenen „Arten“ nicht angegeben werden, kann man sie schwerlich als gültig betrachten, und die Sache selbst wird damit nicht gefördert, so richtig im übrigen auch der prinzipielle Standpunkt des Autors, welcher u. a. Kulturversuche für Beschreibung einer Art verlangt, genannt werden muß. Erst die kurz vor Abschluß des Manuskripts erschienene Arbeit von Stoll (1), deren Resultate hier noch eingefügt werden konnten, erweitert die Bekanntschaft mit den Penicillien durch Mitteilung einer Reihe von Einzelbeobachtungen an den in Kultur verglichenen Spezies. Weitere Klärung auf diesem schwierigen Gebiet werden wir wohl durch die erst im Umriß mitgeteilten Studien Thom's (1) erwarten dürfen.

Daß Form und Größe der Konidien für dieselbe Art konstant ist und Angaben über Umzüchtungen von Formen mit ellipsoidischen in solche mit kugeligen Konidien, wie das Guéguen (2) beschreibt, sehr kritisch aufgenommen werden müssen, bedarf kaum besonderer Hervorhebung.

Ueber die Zahl der existierenden Arten läßt sich Sicheres nicht angeben; von den überhaupt aufgestellten und bei Saccardo (2) verzeichneten vielen Spezies (über 50) ist fraglos eine ganze Zahl zu streichen, zumal die älteren Diagnosen sind gutenteils derart, daß sie nie zu einer Wiedererkennung ausreichen werden; an besser charakterisierten Arten bleibt kaum die Hälfte, von denen aber wieder nur ein Teil als sichergestellt anzusehen ist. Allein von den von Lindau (2) aufgezählten 32 Spezies ist ungefähr die Hälfte als unkenntlich oder fragwürdig zu bezeichnen, da zumal mit den alten Diagnosen von Preuss, Corda, Bonorden heute schwerlich irgend jemand etwas anfangen kann: auch hier hat man früher in der Regel, unbekümmert um das bereits Vorhandene, einfach beschrieben, erklärlicherweise in für heutige Ansprüche ganz unzureichender Weise. Die größte Verwirrung herrscht zurzeit hinsichtlich des als „*Penicillium glaucum*“ bezeichneten Pilzes, offenbar existieren da mehrere einander sehr ähnliche Spezies, die in

der Literatur unter diesem Sammelnamen gehen. Hinsichtlich einer wirklichen Kenntnis der Penicillien stehen wir erst im Anfange. Angefügt sei schließlich eine Uebersicht der *Penicillium*-Arten; es sind hier nur die weiter unten besprochenen, meist besser beschriebenen, bezw. kenntlichen Arten aufgeführt, technisch wichtige gesperrt gedruckt. Vollständige Uebersicht geben SACCARDO (2), auch LINDAU (2).

Uebersicht der Penicillium-Arten.

1. Konidienrasen grün:
   P. glaucum (LNK.?) BREF., Sklerotien mit späterer Ascusbildung, *P. italicum* WEHMER, Sklerotien steril bleibend, *P. olivaceum* WEHMER, *P. luteum* ZUKAL, weichhäutige Ascusfrüchte, *P. rubrum* STOLL, *P. purpurogenum* STOLL, *P. aureum* CORDA, weichhäutige Ascusfrüchte (Perithecien), *P. radiatum* P. LINDNER (Sklerotien?), *P. Wortmanni* KLÖCKER, weichhäutige Ascusfrüchte (wie *P. aureum* und *P. luteum*), *P. Duclauxii* DELACROIX (= *P. luteum*?), *P. Camembert* ad int. (s. auch unter 4), *P. Roquefort* ad int., *P. clavariforme* BAIN., *P. granulatum* BAIN.
2. Konidienrasen gelblich bis bräunlich oder braun:
   P. brevicaule SACC.
3. Konidienrasen rötlich bis rot:
   P. roseum LK. (?).
4. Konidienrasen weiß bis hellgrau:
   P. candidum LK., Sklerotium mit Ascusbildung, *P. Camembert* a. i. (Rasen vorübergehend schwach grün), [*P. insigne* (WINTER) SCHRÖTER; mit Perithecien-Bildung (= *Gliocladium penicilloides*)].

Eine Auftrennung dieser „Formgattung" erscheint zurzeit — wie oben bereits bemerkt — kaum zweckmäßig, selbst wo die Entwicklungsgeschichte den einzelnen Spezies einen verschiedenen Platz im System anweisen muß. So verlangt z. B. die große Verschiedenheit der Ascusfrüchte von *P. glaucum* BREF. und *P. luteum* ZUK. deren Unterbringung in zwei differente Gattungen, eine etwaige weitere Art mit echten Perithecien müßte in eine dritte Gattung gebracht werden, dann blieben noch die zahlreichen nicht unterzubringenden Spezies als „Fungi imperfecti" in einer vierten Gruppe. Dafür darf man wohl eine bessere Kenntnis der Arten überhaupt abwarten, und bis dahin mag die Gattung *Penicillium* eine Gruppe von Spezies, zusammengehalten durch den Konidienträger, bleiben.

§ 48. Die Arten der Gattung Penicillium.

Die häufigeren, meist technisch oder pathologisch wichtigeren Arten stellen wir voran. Von diesen ist *Penicillium glaucum* (LINK?) BREFELD (= *Penic. crustaceum* FRIES?) die wichtigste. Das *P. glaucum* LINK der Literatur ist offenbar ein Sammelname für eine Reihe einander sehr ähnlicher grüner Spezies, deren Durcharbeitung dringend erwünscht erscheint; Farbe der Decken, Verzweigung des Konidienträgers, Gestalt und Größe der Konidien ist bei allen sehr ähnlich. Will man diesen Speziesnamen nicht ganz verschwinden lassen — was LINNÉ, LINK, FRIES und andere vor sich hatten, ist heute nicht mehr festzustellen —, so bezieht man ihn zunächst wohl am besten auf die von BREFELD (2) genauer studierte Art mit sehr kleinen kugeligen Konidien (2.5 μ im Durchm.) und Sklerotienbildung; abweichende wären also neu zu benennen. Daß solche in größerer Zahl existieren, zeigen auch die neueren Untersuchungen von THOM (2) zur Genüge. Unter solchen Umständen ist schwer anzugeben, auf welche Form die in der Literatur vorhandenen zahlreichen Angaben über Vorkommen und Wirkung der

Kollektivspezies „*Penicillium glaucum*“, zu beziehen sind. So zerlegt sich das bei der Käsereifung mitwirkende „*P. glaucum*“ offenbar in mehrere, gut unterscheidbare Arten, die in Reinkultur schon makroskopisch sowohl untereinander wie von „*P. glaucum*“ anderer Standorte 5 verschieden sind und von denen zwei auf S. 226 als *P. Roquefort* und *P. Camembert* aufgenannt werden mögen. Verschieden davon scheint wieder die rundsporige Form, bezw. die Formen, welche als Fäulniserreger reifer Früchte auftreten, aber bislang kaum näher verfolgt sind. Wie sich dazu die auf Hopfen, dachreifem Tabak, bei der 10 Lederfabrikation, bei der Weingärung (Schimmelgeschmack des Weines) beobachteten, als *P. glaucum* LINK bezeichneten grünen Schimmel stellen, muß gleichfalls offen bleiben, solange sie nicht nach den in der Mykologie üblichen Methoden genauer miteinander verglichen sind. Relativ leicht unterscheidbar ist die Gruppe dieser rundsporigen noch 15 von den weiterhin aufgenannten ausgesprochen langsporigen Spezies (*P. luteum*, *P. italicum*, *P. olivaceum*) sowie von makroskopisch sehr ähnlichen aber durch den Sporenträgerbau sofort unterscheidbaren Angehörigen anderer Gattungen (*Citromyces*-Arten, *Aspergillus fumigatus*), obschon auch mit diesen Verwechslungen in der Literatur vorgekommen 20 sein mögen, wenn grüne Schimmeldecken einfach als *P. glaucum* LINK benannt sind; nichts ist so täuschend als die einer Vielzahl von Arten zukommende, ganz gleiche grüne Farbe der Konidienrasen, 25 die meisten Penicillien sind eben grün.

Das *Penicillium glaucum* im Sinne 30 BREFELD's (1) zeigt folgende Merkmale (s. *Fig. 71*). Die Konidien sind kugelig, glatt, 2,5 35 μ dick, in langen, zusammenhängenden Ketten auf zylindrischen, zugespitzten, ca. 8 bis 40 13 μ langen und 3—4 μ dicken Sterigmen. Der Konidienträger ist in der Verzweigung 45 sehr variabel (s. Abbildg.), 200—400 μ hoch, jeder Zweig mit einem Büschel von (bis 12) Sterig- 50 men besetzt, die gewöhnlich merklich kürzer als ihre Tragzellen sind.

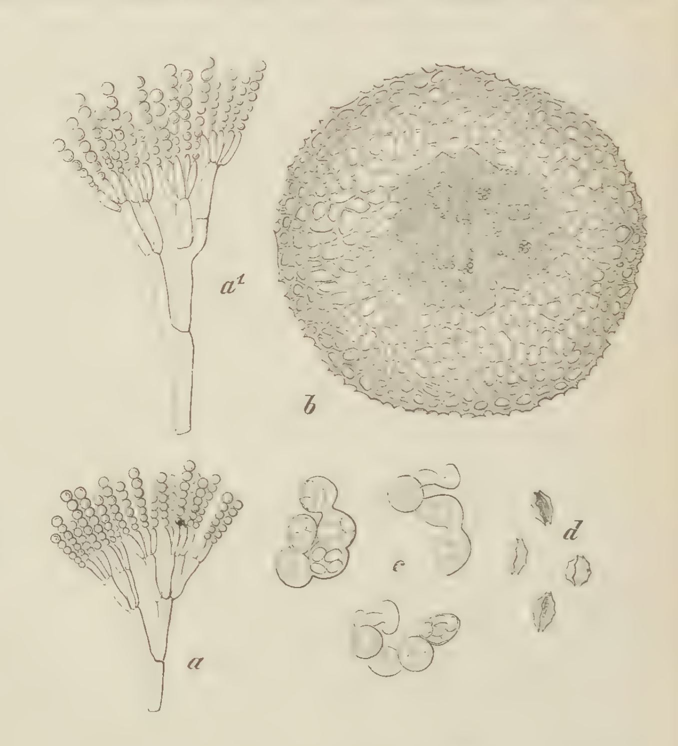


Fig. 71. Penicillium glaucum.
Konidienträger, die verschiedenartige Verzweigung zeigend (*a*, *a'*), Ascusfrucht mit reifenden Ascis (*b*), isolierte Asci, in Sporenbildung begriffen (*c*); Sporen, von der Seite gesehen (*d*). Vergr. von *a*: 315, von *b*: 150, von *c*: 630, von *d*: 800. Nach BREFELD.

Die Farbe der Rasen oder Decken ist heller oder dunkler grün, im Alter verfärbt, das Gefüge dicht, nicht wollig, mit Massen von Konidien bedeckt. Unter gewissen Bedingungen, doch wenig regelmäßig, bildet die Art kleine sandkorngroße, kugelige bis knollige, harte Sklerotien von 0,1—0,8 mm Durchmesser, in denen es nach einer Ruheperiode allmählich unter Resorption des zentralen derben Gewebes zur Ascusbildung kommt. Die kugeligen bis ellipsoidischen, dicht gedrängt liegenden Asci (12—15 zu 8—10 μ) zerfallen schließlich, so daß zur Reifezeit (nach ca. 7—8 Monaten) das Innere des von einer zwei- bis dreischichtigen Rinde umschlossenen Organs mit freiliegenden, hellgelblichen, ellipsoidischen Sporen (5—6 zu 4—4,5 μ) angefüllt ist. Die einzelne, mit Längsfurche und 3—4 Querrippen versehene Spore wirft bei der Keimung die beiden Episporhälften ab. Nach BREFELD's früheren Angaben entsteht das Sklerotium aus zwei besonderen Hyphen (Ascogon und Pollinodium) durch eine Art Befruchtungsprozeß, die Asci dann weiterhin als Seitensprosse des Ascogons, wogegen ZUKAL (2) die Bildung aus völlig gleichartigen, einfach vegetativ miteinander verwachsenden Hyphen angibt und die Asci sich aus den Fäden entwickeln sah, die aus der innern Wand des hohl gewordenen Sklerotium heraus in den Hohlraum hineinwachsen.

Daß den verschiedenen Autoren unter „*P. glaucum*" nicht immer derselbe Pilz vorlag, wird schon durch die abweichenden Konidienmaße wie insbesondere auch durch die Angaben über Temperaturgrenzen nahegelegt. Nur die Konidiengröße SCHRÖTER's (1), nämlich 2—3 μ, sowie die WEHMER's (10), nämlich 3 μ, stimmt hinlänglich mit der BREFELD's (2), indes SACCARDO (1) schon 4 μ, LINDAU 3—4 μ (bei kugeligen oder ellipsoidischen Konidien) und STOLL (1) schließlich 3,8—4,3 μ angibt. Insbesondere scheint letzterer eine wesentlich abweichende rundsporige Form vor sich gehabt zu haben, da sie noch bei 37° ebensogut wie bei 8° wuchs und das Maximum sogar oberhalb 40° lag; tatsächlich versagen aber die meisten der hierhergehörigen Formen bereits bei 37° vollständig. Andere fanden Minimum und Maximum ihres *P. glaucum* bei 1,5—2° bezw. 33—35°. Wenn GRAWITZ früher den Pilz an die Temperatur von 38—40° akklimatisiert und nunmehr gelungene Infektionsversuche an Tieren gemacht haben wollte, so hat er schwerlich eine Form von *P. glaucum* vor sich gehabt. Die von STOLL (1) kultivierte Form lieferte auf saurem Agar nach mehrfachem Ueberimpfen rein weiße statt der grünen Decken, also eine weiße Form, die dem *P. candidum* LINK ähnlich war, auf gewöhnlichem Substrat aber sogleich wieder in die grüne Form überging, also den normalen Konidienfarbstoff erzeugte. Für die Annahme GUÉGUEN's (2), daß die als *P. glaucum* bezeichnete Art in der Konidiengestalt etc. sehr variabel sei, eine rundsporige Form auch in eine langsporige übergehen könne, fehlt der wirkliche Nachweis; die Sache ist auch wenig wahrscheinlich und erklärt sich vielleicht durch das Vorliegen eines Gemenges verschiedener einander sehr ähnlicher Arten; gerade Gestalt und Größe reifer Konidien sind nach dem Bisherigen recht beständig, und wirkliche Erfahrungen über Variabilität morphologischer Merkmale einer dieser Formen — die Unbeständigkeit der Konidienträger-Verzweigung hier ausgenommen — liegen kaum vor. Angaben über Sklerotien findet man u. a. auch bei WINTER (1), GUÉGUEN (2), solche über Coremien-Bildung außer bei BREFELD (2) noch bei HENNINGS (2).

Die zwei folgenden Arten sind nach den Untersuchungen THOM's (2)

bereits von dem BREFELD'schen Pilz abzutrennen, auch morphologisch wie kulturell untereinander verschieden. THOM bezeichnet sie als „*Roquefort-*" und „*Camembert-Mold*", sie mögen hier, da Speziesnamen dafür noch nicht existieren, provisorisch als *P. Roquefort* und *P. Camembert*
5 aufgeführt sein.

Penicillium Roquefort, Roquefort-Mold THOM's (2), bislang gewöhnlich als *P. glaucum* LINK bezeichnet, was wohl keineswegs feststeht, ist von dem BREFELD'schen *P. glaucum* durch die fast doppelt so großen Konidien offenkundig verschieden. THOM läßt die von ihm genauer studierte
10 Art, die regelmäßig bei der Roquefort-Käsereifung in den grünen Adern konidienbildend vorkommt, bezüglich der Zugehörigkeit offen. Der Konidienträger ist 200—300 μ hoch, 4 μ dick, die Konidienköpfchen sind im Mittel 90—120 μ hoch, die Zweige des Trägers sind unregelmäßig wirtelig mit 9—11 μ langen und 2.5 μ dicken Sterigmen.
15 Die Konidien sind bläulich-grün, meist kugelig, glatt, groß und haben 4—5 μ im Durchmesser. Die Decken sind tiefgrün, später verfärbt (schmutzigbraun), deren Unterseite gelblich-weiß. Ascusfrüchte sind unbekannt. Zucker-Gelatine der benutzten Zusammensetzung wurde kaum verflüssigt. Lackmus schnell von rot in blau verändert. Konidien-
20 keimung und Entwicklung sehr schnell, innerhalb 36 Stunden oft schon reiches Mycel mit Konidien; durch das schnelle Wachstum schon von dem *Penicillium Camembert* verschieden, auch sind die Konidien gegen Austrocknen minder empfindlich und bewahren monatelang ihre Keimfähigkeit. Der Käsemasse erteilt die Art nach CONN, THOM, BOSWORTH,
25 STOCKING und ISSAJEFF (1) bitteren Geschmack. Die Art ist nach THOM für Roquefort-Käse charakteristisch, findet sich auch auf vielen anderen Substraten und scheint allgemein verbreitet; vergl. Bd. II, S. 186.

Penicillium Camembert oder Camembertschimmel, Camembert-Mold THOM's (2), Camembert-Penicillium, ist eine von den übrigen offenbar
30 verschiedene Art, die regelmäßig bei der Reifung der Camembertkäse mitwirkt. COHN, THOM, BOSWORTH, STOCKING und ISSAJEFF (1) nennen es einfach Camembert-Pilz, ließen also die Spezies angesichts der bis dahin fehlenden Beschreibung und zweifelhaften Zugehörigkeit unbestimmt. Als Camembert-Mold (*P. album* EPSTEIN?) benennt es auch
35 THOM (2), der die Art neuerdings genau beschreibt. ROGER's (1) *P. candidum* vom Brie-Käse (1898) sowie EPSTEIN's (1) *P. album* vom Camembert-Käse (1902), für die morphologische Beschreibung bislang fehlen, sind vielleicht mit ihm identisch. Die Spezies wäre dann aber schließlich nicht als *P. Epsteini*, wie LINDAU (2) will, sondern etwa als *P. Rogeri*
40 neu zu benennen. Die Decke ist nach THOM's Angaben zunächst weiß, ausgesprochen wollig (nicht glatt!), allmählich geht ihre Farbe in leichtes graugrün und weiter in grauweiß über. Die Konidienträger sind 300—800 μ lang, 3—4 μ dick, das Konidienköpfchen hat bis 175 μ Länge, ist schwach verzweigt. Sterigmen sind wenig zahlreich (8—11 μ zu
45 2,4—3 μ), die reifen Konidien sind kugelig (jung zylindrisch bis ellipsoidisch), bläulichgrün, groß, 4,5—5.5 μ dick, glatt. Die Mycelfäden sind ca. 5 μ dick. Konidienbildung tritt nur an freier Oberfläche, nicht in Hohlräumen des Substrats ein. Zucker-Gelatine wird nur unterhalb der Kolonie verflüssigt, Lackmus färbt sich dabei zunächt rot, aber bald
50 wieder blau. Die mit dieser Art geimpften Käse bedecken sich innerhalb einer Woche mit einem wolligen weißen Mycel. Im Freien scheint der Pilz nicht vorzukommen. THOM betrachtet ihn als eine typische Molkerei-Form, die unter anderen Bedingungen nicht fortkommt; selbst als In-

fektion geht er selten auf andere Käse über. Die Konidien verlieren schon durch ein wenige Wochen dauerndes Austrocknen ihre Keimfähigkeit. Milch soll ohne vorherige Koagulierung peptonisiert werden und nimmt eine schwach gelbliche Farbe an, doch nicht den durch „*P. glaucum*“ (Roquefort-P.) verursachten scharfen ammoniakalischen Geruch. Die im Kultursubstrat zunächst auftretende schwache Acidität verschwindet rasch wieder. In Reinkulturen ist die Art von den beiden vorhergenannten auf den ersten Blick zu unterscheiden. Vergl. Bd. II, S. 186.

Penicillium luteum ZUKAL bildet grüne Schimmeldecken, welche von denen anderer Arten durch schwach b r ä u n l i c h e n Ton (olivfarben) unterschieden sind, die sterilen Mycelien sind oft durch leuchtend c i t r o n g e l b e Färbung, die weiterhin durch die beginnende Konidienbildung verdeckt wird und höchstens am Rande sichtbar bleibt, kenntlich. Von den gewöhnlichen Arten ist es durch kleine e l l i p s o i d i s c h e Konidien und sehr lange Sterigmen unterschieden. Die gleichfalls häufige, auf schimmelfähigen Substraten (Rinden, Früchte, Kleister u. a.) zumal sauren Charakters (Citronen) mit Vorliebe auftretende, nach J. BEHRENS (3) vermittelst giftiger Produkte auch Fruchtfäule hervorrufende Art wird durch Zähigkeit und schnelles Wachstum an Orten, wo sie einmal sich eingenistet hat, sehr lästig; andere Pilzarten, deren Decken sie inficiert, verdrängt sie oft rasch durch Abtötung und völlige Ueberwucherung, so nach WEHMER (6) insbesondere auch *Citromyces*, auf dessen Decken braune schlüpferige peripher sich rasch ausbreitende tote Flecke erzeugend. Die Lebenszähigkeit der Konidien ist jedoch nur gering, gewöhnlich sterben sie bereits binnen ein bis zwei Jahren sämtlich ab. Die von WEHMER (7) genauer

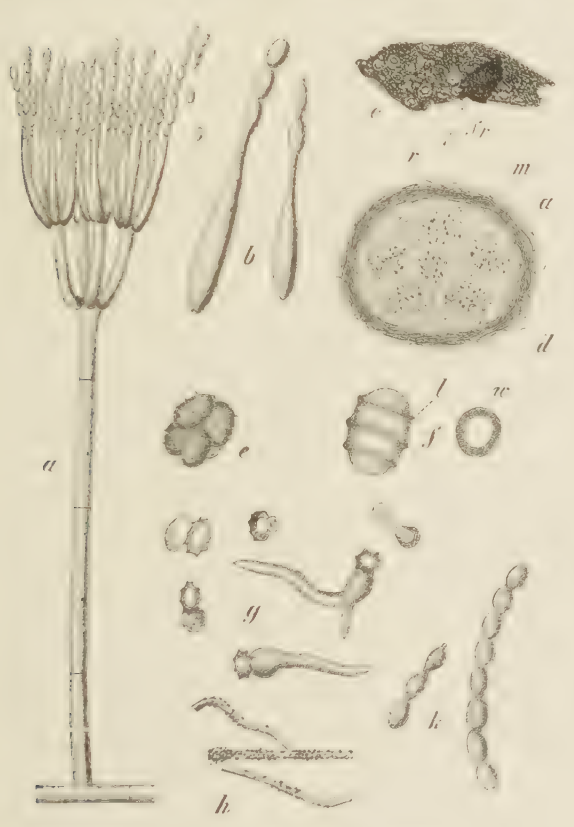


Fig. 72. Penicillium luteum.
Typischer Konidienträger (*a*), Sterigmen (*b*) und Konidien (*k*); *c* Ascusfrüchte auf der Pilzdecke (nat. Gr.), *d* eine solche im Querschnitt mit Mark (*m*), Rinde (*r*) und Ascusgruppen (*a*), *e* freier Ascus, *f* Sporen von der Seite und im Querschnitt mit tonnenbandartigen Leisten, *g* Ascosporenkeimung, *h* Hyphen mit gelben Körnchen. — Vergr. von *a*: 1000, von *b*: 2000, von *d*: 15, von *e*: 1200, von *f*: 2400, von *g*: 900, von *h*: 500, von *k*: 2000. Nach WEHMER.

untersuchten zarten Konidienträger (s. *Fig. 72*) sind in ihrer Verzweigungsart der vorhergehenden Spezies ähnlich, im ganzen aber durch Neigung zur Wirtelbildung ausgezeichnet, so daß der Hauptfaden gewöhnlich nur einen Quirl von 2—4 mit Sterigmenbüscheln abschließenden Aesten erster Ordnung entwickelt; Abweichungen verschiedener Art kommen jedoch vor. Die Sterigmen (17 zu 2,1 μ) sind mehr zugespitzt und relativ (auf das Köpfchen bezogen) länger als bei den meisten anderen Spezies, die Konidien deutlich gestreckt (ellipsoidisch), sehr klein (2,3—3 zu 1,4—2 μ, s. auch *8* in Fig. 70 auf S. 220), glatt, zart, in den langen Ketten ziemlich fest aneinanderhängend, mattgrau, gehäuft bräunlichgrün. Coremienbildung ist zufolge WEHMER (8) häufig, gelegentlich massenhaft, von besonderer Schönheit und bis 1 cm hoch. Ascusfrüchte, von ZUKAL (3) zuerst beobachtet, von WEHMER (7) näher beschrieben, entstehen in der Regel reichlich als citronen- bis goldgelbe, im Alter dunkel orangefarbene und schließlich mißfarbige, 1—2 mm im Durchmesser haltende, mehr oder weniger kugelige, zarthäutige Gebilde auf der Deckenoberfläche. Die aus locker verwebten Hyphen bestehende, ca. 100 μ dicke, goldgelbe, später braunrote Rinde umschließt farbloses Fadengeflecht mit nesterweis verteilten ellipsoidischen Ascis (9—11 zu 6—8 μ) mit je 4—8 (im Mittel 5) tönnchenförmigen derbwandigen Sporen 4—5 zu 2,8 μ), die gegenüber denen von *P. glaucum* BREFELD ohne Längsrinne, aber mit 3—4 zarten Querleisten versehen sind, bei der Keimung auch nicht das Epispor in zwei Hälften abwerfen, sondern ohne Verquellung durch feinen Riß den sich außerhalb zu einer voluminösen „Sekundärspore“ formierenden Inhalt austreten lassen; hier erst findet die Entwicklung des Keimschlauches statt. Die Rinde älterer Fruchtkörper (von einigen Wochen) ist nicht mehr weichhäutig sondern sehr brüchig und umschließt gewöhnlich die bereits freiliegenden Sporen als helle gelbliche Staubmasse. Es bedarf keiner Frage, daß derartige, zunächst nur einen locker verflochtenen Hyphenknäuel mit gesonderten Ascusgruppen darstellende Ascusfrüchte die Stellung der Art außerhalb der Aspergillaceen rechtfertigen würden; die derjenigen des *Gymnoascus* ähnliche Fruktifikation ist von der des *P. glaucum* BREFELD ganz verschieden. Die lebhaft gelbe Farbe der jungen Mycelien sowie der Fruchthülle des *P. luteum* hat ihren Sitz in reichlich von den Hyphen ausgeschiedenen und sie dicht bedeckenden gelben Körnchen (eines in Alkohol löslichen Pigments, von ZUKAL als eine „Pilzsäure“ angesprochen), die bei *P. glaucum* fehlen, aber auch bei *P. luteum* nicht konstant zu sein scheinen. Zuckerhaltige Nährflüssigkeiten säuert der Pilz durch Bildung freier Citronensäure leicht an.

Penicillium italicum WEHMER ist ein nach WEHMER (11) nur auf ganz bestimmten Substraten (Apfelsinen, Citronen, Mandarinen und ähnlichen Südfrüchten) vorkommender, durch bläulich-grauen Farbenton der grünen Decke von den vorhergenannten verschiedener Schimmel, dessen Konidienträgerbau (s. *Fig. 73*) dem des *P. glaucum* BREF. entspricht, doch mit ellipsoidischen (nicht kugeligen) Konidien. Der auf genannten Früchten ungemein häufige, wohl mit ihnen aus deren Vaterlande importierte Pilz ruft im weitesten Umfange die Fäulnis zumal der reifen Apfelsinen hervor und kann auf dem Transporte innerhalb der geschlossenen Kisten den ganzen Inhalt vernichten. Dem außen rasch um sich greifenden Schimmelfleck entspricht ein ebensolches Durchwachsen des dadurch fauligweich werdenden Fruchtfleisches. Die zarten,

farblosen, nur hyphendicken, ca. 250 μ Länge erreichenden **Konidienträger** zeigen 2—3 ungleich hoch angesetzte, aufrecht gerichtete Seitenzweige, die gleichwie der Hauptfaden, doch nicht immer in gleicher Höhe, mit einem Sterigmenbüschel (ca. 2—6) abschließen. Die von dem einzelnen, schlanken, nach oben etwas verjüngten Sterigma (ca. 10 zu 3 μ) in langen Ketten sich erhebenden, ellipsoidischen, zarten **Konidien** hängen zunächst wie die Zellen einer dicht septierten Hyphe fest zusammen, runden sich also erst später unter gleichzeitiger erheblicher Volumenvergrößerung und Verbandslockerung ab und messen dann ziemlich gleichmäßig ca. 4—5 zu 3 μ, doch auch bis 6,1 zu 4 μ. Einzeln fast

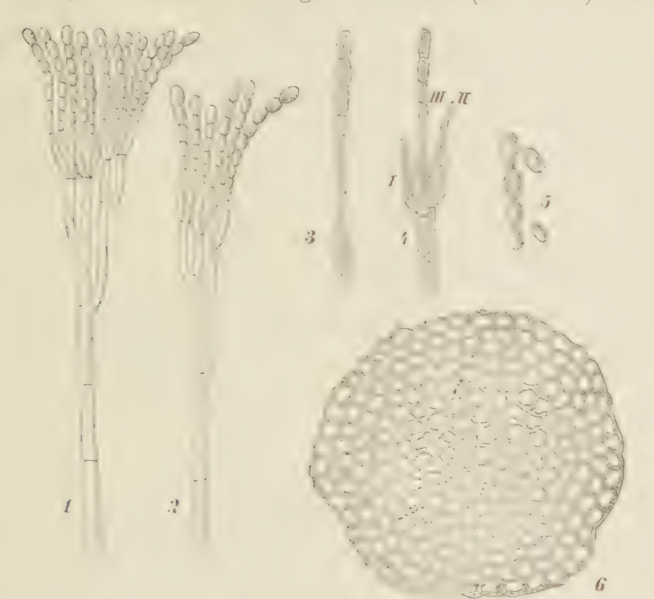


Fig. 73. Penicillium italicum.
Konidienträger *(1, 2)*, Sterigmen *(3, 4)* und Konidien *(5)*; Querschnitt durch ein älteres Sklerotium *(6)*, die gefärbten Rindenschichten stärker schattiert. — Ungef. Vergr. von *1—2*: 400, von *3—4*: 600, von *5*: 700, von *6*: 90. Nach WEHMER.

farblos, tritt auch hier die dem Schimmelüberzuge das charakteristische Aussehen gebende Färbung erst bei haufenweiser Beisammenlagerung hervor. Der Pilz erzeugt reichlich **Sklerotien**, sie weichen in Größe, Form und derber Struktur kaum von denen des *P. glaucum* BREF. ab; es sind kleine, ca. 300 μ im Durchmesser haltende, von Mycel umhüllte oder nackte, glatte, braune, ziemlich regelmäßige, harte, spröde Kügelchen, durch Zerreiben der Pilzdecke zwischen den Fingern leicht und fast jederzeit zu isolieren. Da sie bislang den Versuchen zur Erzielung von Ascosporen-Bildung widerstanden, müssen wir sie einstweilen als steril betrachten; darin stimmen sie also mit denen von *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus* und *A. niger* überein. Ueber ihre Entwicklungsgeschichte ist Genaueres bislang nicht bekannt. Der Pilz ist auf den üblichen mykologischen Substraten leicht zu kultivieren und bildet auf Zuckerlösungen mit anorganischen Salzen derbe, dichtverflochtene, unterhalb farblose, oberhalb hell- bis graugrüne, massenhaft Konidien erzeugende Decken. Das Temperaturoptimum liegt nach STOLL (1) bei 25°, das Minimum ist 10°. Die Gelatineverflüssigung tritt träge ein oder bleibt (je nach Zusammensetzung) ganz aus.

Penicillium olivaceum WEHMER kommt wie der vorhergehende zufolge WEHMER (10) fast nur als Fäulnispilz auf reifen Südfrüchten der gleichen Art vor, nicht selten neben ihm auf der gleichen Frucht, doch minder häufig. Vereinzelt tritt er auch auf einheimischem Obst auf, so nach ZSCHOKKE (1)

auf Birnen, hier träge Fäulnis erregend. Die Angaben ZSCHOKKE'S schließen nicht ganz aus, daß es sich da nicht um *P. olivaceum*, sondern vielmehr um *P. luteum*, das ja auch von BEHRENS (3) auf Obst gefunden wurde, handelt. Die Farbe der Schimmelvegetation ist erklärt braungrün 5 (olivfarben), ähnlich *P. luteum*, doch lebhafter und ohne dessen gelbe Körnchenausscheidung der sterilen Hyphen, auch mit zierlicheren, nicht für das bloße Auge hervortretenden Konidienträgern, so daß die Rasen kaum fädig erscheinen. Die bis ca. 200 μ langen Träger (s. *Fig. 74*) sind denen der beschriebenen drei Spezies gegenüber minder regelmäßig 10 gebaut, indem eine bestimmte Art der Verzweigung als Durchschnitt kaum hervortritt; die Zahl der Seitenzweige beträgt 1—3, alternierend oder ungleich 15 verteilt, je mit wenigen (2—3) langgezogenen Sterigmen (ca. 14 zu 3 μ). Die Konidien sind in der Form denen des *P. italicum* ähnlich, also ellipsoidisch, 20 doch weit größer, durchschnittlich 6—7 zu 4 μ und selbst bis 10 zu 6 μ messend, in leicht zerfallenden Ketten und nur die jüngeren, wesentlich kleineren 25 ($^1/_3$—$^1/_2$ so groß) fest zusammenhängend. Die Konidien erreichen also bis mehr als die doppelte Größe von denjenigen der vorhergehenden Spezies. Fruchtartige Bildungen sind bislang nicht beobachtet worden. Die Art wächst auch auf künstlichen Substraten als 30 gelbgrüne Schimmeldecke. Das Wachstumsoptimum liegt bei 23—25°, das Minimum bei ca. 10°. Das Gelatineverflüssigungsvermögen ist sehr schwach; Näheres darüber sowie andere kulturelle Beobachtungen bei STOLL (1).



Fig. 74. Penicillium olivaceum. Konidienträger und Konidien. — Annäh. Vergr. von *1—2*: 400, von *3*: 500. Nach WEHMER.

Penicillium brevicaule SACCARDO, von SACCARDO (1) neben anderen 35 Schimmelformen auf moderigem Papier beobachtet, ist zum Arsennachweis von GOSIO (1) empfohlen worden. Es bildet in Substraten mit einer Spur Arsenverbindungen intensiv riechendes Diäthylarsin (s. Bd. I. S. 294). Die morphologischen und biologischen Verhältnisse sind erst neuerdings von STOLL (1) etwas näher verfolgt, wenn auch noch keineswegs erschöpft 40 worden. Die Decken sind je nach Alter und Substrat bräunlichgelb bis braun. Die Konidienträger (s. *Fig. 75*) sind zart und klein, unregelmäßig verzweigt, meist mit spärlichen Aesten und Sterigmen, letztere wenig charakteristisch, ziemlich lang (ca. 16 zu 3.5 μ). Die gelblichen, glatten Konidien sollen nach STOLL zweierlei Art sein, 45 und zwar kugelig (ca. 6,5 μ im Durchmesser) oder birnförmig (10 zu 6 μ); SACCARDO gibt kugelige, oft warzige Konidien (5—7 μ) an. Diese Angaben über Konidienbeschaffenheit bedürfen jedoch der Richtigstellung, ihre Gestalt ist weder kugelig oder birnförmig noch schlechthin kugelig, sondern in Kulturen auf verschiedenem Substrat recht variabel, man 50 findet sie sowohl länglich birnförmig, ellipsoidisch wie kugelig, glatt wie feinstachlich oder warzig; bei typischer Ausbildung auf gutem Substrat (Würze-Gelatine) sind die reifen Konidien aber deutlich warzige mit breitem Stielansatz versehene Kugeln, die rasch auseinander

fallen. Jüngere Stadien sind gestreckt, oft zugespitzt und gleichfalls mit deutlichem Stielansatz (s. auch Fig. 70). Ausgebildete Exemplare messen 6,8—9,2 zu 5,7—6,8 μ. Gestaltlich sind diese Konidien von denen aller anderen *Penicillium*-Arten also merklich verschieden. Sklerotien oder Ascusfrüchte sind bislang nicht beobachtet worden. Die Art wächst nur mäßig rasch auf den gebräuchlichen bakteriologischen Substraten, verflüssigt auch Gelatine; das Wachstumsoptimum liegt bei ca. 20—23°, unter 15° ist die Entwicklung träge. Auf alkalischer Gelatine (nicht auf Zucker- oder saurer Gelatine) entwickelt sie nach Stoll deutlich Ammoniak. Die Sporen entstehen bisweilen ohne Sterigmen und Träger direkt am Mycel (s. Abb.), dies wie die gesamte Morphologie der Art bedürfte einmal näheren Verfolges; das bisher darüber Mitgeteilte ist wenig erschöpfend. —

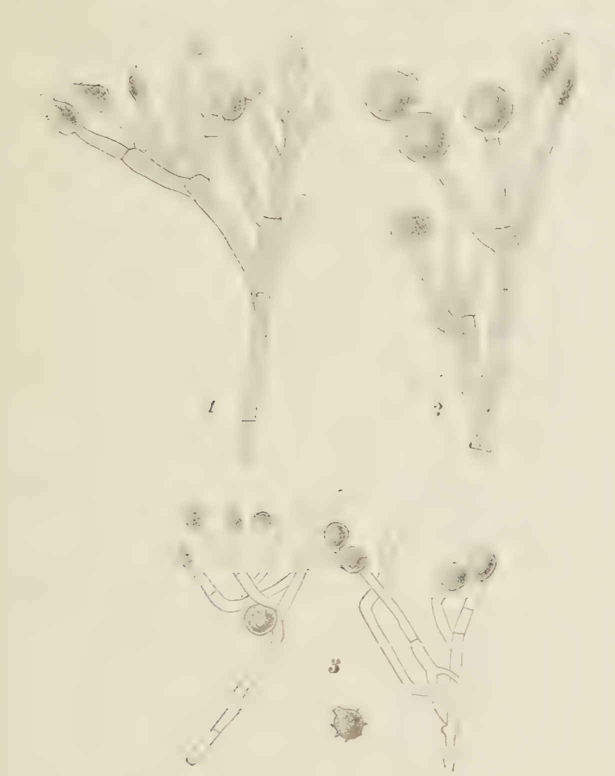


Fig. 75. Penicillium brevicaule.
Konidienbildung an besonderen Trägern (*1* u. *2*) sowie direkt am Mycel (*3*), erstere von einer Würze-Gelatine, letzteres von einer Nähr-Agar-Kultur. Der Konidienträger *1* mit nur jüngeren, in der Entwicklung begriffenen gestreckten Konidien; *2*: mit reifen, zum Teil abgefallenen, neben drei jüngeren noch nicht durch Querwand abgegliederten Konidien. (Vergl. auch *2* von Fig. 70 auf S. 220). Ungef. Vergr. von *1* u. *2*: 500 bez. 800, von *3*: 400. Origin.

Von weniger bekannten, anscheinend selteneren, praktisch unwichtigen Arten seien die nachfolgenden genannt.

Penicillium purpurogenum Stoll ist von Stoll (1) beschrieben worden, der die Art von Král erhielt, nach letzterem stammte die Originalkultur von Fleroff, der sie aus unreinem japanischen Koji isoliert haben soll. Hinsichtlich der Konidienträger, Konidiendeckenfarbe und Farbstoffbildung ähnelt sie *P. luteum*. Die Decken sind dunkelgrün bis dunkelgraugrün, die Konidienträger zart, wirtelig verzweigt, jeder Zweig mit gewöhnlich vier länglichen, zugespitzten Sterigmen (7 zu 2 μ). Die Konidien sind ellipsoidisch, sehr klein (2,8 zu 1,7 μ), in Form und Größe gleichartig. Das Optimum liegt bei ca. 30°; unter 15° tritt kein Wachstum ein; der Pilz entwickelt sich noch bei Brutwärme. Er bildet gelbroten bis purpurroten Farbstoff, jedoch nur auf kohlenhydrathaltigen Substraten; die sterilen Mycelien sind intensiv gelbrot.

Penicillium rubrum STOLL ist eine von GRASSBERGER isolierte und durch STOLL (1) im Jahre 1904 beschriebene Art unbekannter Herkunft. Die Hyphen sind durch Körnchenausscheidung gelb bis gelbrot, die Konidienrasen dunkelgrün mit oft wirtelig verzweigten zarten Trägern;
5 die Zweigenden tragen je 4—5 lange, zugespitzte Sterigmen (9,6 zu 2 μ). Die Konidien sind kugelig, sehr klein (2,3 μ im Durchmesser), in leicht zerfallenden kurzen Ketten. Das Optimum liegt bei 30—35°. Die Art wächst noch bei Brutwärme; unter 15° entwickelt sie sich nicht. Sie erzeugt gelbroten bis rostbraunen Farbstoff, aber nur auf
10 Kohlenhydrate enthaltendem Substrat; derselbe ist von dem der vorhergehenden Art verschieden. Fruchtartige Bildungen sind unbekannt. Ueber kulturelles Verhalten im Vergleich zu den beiden vorhergehenden Arten s. STOLL (1).

Penicillium bicolor FRIES, eine von OUDEMANS (4) beschriebene, aus
15 Erde isolierte Art, welche, falls nicht mit anderen übereinstimmend, vielleicht besser neu zu benennen wäre, bildet graugrüne Decken oder Polster mit schwefelgelbem Rand (ähnlich *P. luteum*), doch sind die Konidien kugelig (2,3 μ im Durchmesser). Die Konidienträger sind zwei- bis dreimal vierteilig, die Sterigmen zylindrisch, zugespitzt
20 mit langen Konidienketten. Es dürfte heute wohl kaum noch festzustellen sein, welcher Pilz FRIES vorlag, wenn die gelbe Peripherie der Polster übrigens auch die Verschiedenheit von „*P. glaucum*" dartut.

Penicillium claviforme BAINIER ist im Jahre 1905 auf Eichenrindenpulver in Apotheken von BAINIER (1) beobachtet worden. Die Art ist
25 durch Bildung anfangs schneeweißer, späterhin ergrünender, 1—2 cm hoher Keulen, welche denen von *Isaria* ähnlich sind und auch massenhaft in Reinkultur entstehen, so auffällig, daß sie mit keiner anderen verwechselt werden kann. Die Konidien messen 4,2 zu 3,1 μ und sind reingrün. Sie wäre vielleicht zu *Isaria* zu stellen.

30 *Penicillium granulatum* BAINIER ist auf Eichenspänen im Walde beobachtet worden. Es bildet gelben Farbstoff. Die Konidien sind kugelig bis ellipsoidisch, 2,6 zu 2,1 μ messend. Diese Art wurde wie die vorhergehende von BAINIER (1) in Kultur gezogen. —

Als Arten, die noch genauerer Beschreibung bedürfen,
35 teilweise wohl synonym und kritisch sind, seien nachfolgende genannt.

Penicillium roseum LINK bildet auf Vegetabilien rötliche Ueberzüge. Nach OUDEMANS' (1) Beschreibung messen die Konidien 5—6 zu 2—2,3 μ. Die Art ist offenbar seltener, bedarf auch noch näherer Bearbeitung.

40 *Penicillium radiatum* P. LINDNER weicht durch derbwandige, dunkelfarbige Konidienträger — anscheinend neben zarteren — von den anderen Arten ab. Die Konidien sind grün, kugelig. Diese Art wurde auf Preißelbeeren von P. LINDNER (1) gefunden, hier kugelige, schwarze Sklerotien bildend. Genaueres bleibt durch nähere Untersuchung noch
45 festzustellen.

Im Waldhumus sind neuerdings (1902) von OUDEMANS (2) mehrere Arten gefunden worden, die hier als genaueren Studiums bedürftig nur kurz aufgeführt sein mögen; nach Abbildung und Beschreibung ist es fraglich, ob da neue Spezies vorliegen.

50 *Penicillium geophilum* OUDEMANS bildet Konidienträger, die ca. 360 μ hoch, 6 μ dick, septiert und mit einem Wirtel flaschenförmiger, bis 30 μ langer Zweige (Sterigmen) versehen sind, welche direkt die Konidien abschnüren. Die Konidien sind kugelig, grün und haben

3—4 μ im Durchmesser. Die Art mit ihren unverzweigten Konidienträgern gehört übrigens zur Gattung *Citromyces*.

Penicillium humicola OUDEMANS ist gelbgrün. Die Konidienträger messen ca. 110—120 zu 1—1,5 μ (wohl Druckfehler?) und sind wirtelig verzweigt. Die Konidien haben 2 μ im Durchmesser. Die (schematische) 5 Abbildung bei OUDEMANS zeigt nichts Eigenartiges.

Penicillium desciscens OUDEMANS ist ähnlich der vorhergehenden Art. Der Konidienträger ist wiederholt verzweigt, die Konidien haben der Beschreibung zufolge 2—3 μ im Durchmesser, sind nach der Abbildung des Autors jedoch ellipsoidisch (vielleicht *P. luteum?*). 10

Penicillium silvaticum OUDEMANS ist braun. Die Konidienträger messen 210 zu 2—3,5 μ, sind septiert, mit einem Wirtel flaschenförmiger Zweige (Sterigmen), welche direkt Konidien abgliedern, die kugelig und hellbraun sind und 2—3 μ im Durchmesser haben. Der unverzweigte Konidienträger schließt die Art gleichfalls von *Penicillium* 15 aus; anscheinend ist dieselbe identisch mit *P. geophilum* und zu *Citromyces* zu stellen.

Penicillium candidum LINK bildet weiße Rasen. Konidienträger und Konidien angeblich mit denen des „*P. glaucum*" übereinstimmend. Die Konidien sind kugelig und haben 2—3 μ im Durchmesser. Es findet 20 sich auf allerlei Vegetabilien. Genauere Angaben über diese Art fehlen, doch will MORINI (1) Sklerotien mit Ascusbildung beobachtet haben; die eiförmigen Asci, 24—30 μ lang, enthielten je 8 eiförmige, glatte Sporen, deren Größe 6,5—9 zu 3,5—5 μ war.

Ein nicht genauer beschriebenes als *P. candidum* benanntes weißes 25 Penicillium spielt nach ROGER (1) bei der Reifung der Brie-Käse eine Rolle, diese mit hellen Rasen überziehend. EPSTEIN (1) nannte den auch von ihm gefundenen Pilz *P. album*, die Identität mit dem alten *P. album* PREUSS aus dem Jahre 1851 steht aber wohl ganz dahin, ebenso fraglich ist, ob es mit dem genannten *P. candidum* LINK über- 30 einstimmt. Es handelt sich vermutlich um das schon oben genannte, vorübergehend schwach ergrünende später grauweiße *P. Camemberti*.

Penicillium Duclauxii DELACROIX bildet Rasen, welche erst weiß oder schwefelgelb, später olivengrün werden. Die Sterigmen sind zylindrisch-spindelförmig. Die Konidien sind ellipsoidisch-kugelig und 35 haben 3—4 μ im Durchmesser. Ist auf im Wasser liegenden Trauben gefunden worden. Nach der Beschreibung der Art durch DELACROIX (1) handelt es sich vielleicht um ein *P. luteum*.

Penicillium insigne (WINTER) SCHRÖTER bildet weiße Konidienrasen und länglich-ellipsoidische Konidien. Der Bau der Träger ähnelt ganz 40 dem von *P. luteum*. Es wurde von WINTER (1) als *Eurotium insigne* beschrieben und ist nach SCHRÖTER (1) mit *Gliocladium penicilloides* CORDA identisch. Es besitzt hellgelbbraune, kugelige Perithecien (0,25—1 mm im Durchm.) mit glatter, dünner pseudoparenchymatischer Rinde, länglich-ellipsoidischen achtsporigen Ascis (35—50 zu 28—35 μ), kugeligen, hell- 45 bräunlichen, stachligen, derbwandigen, großen Sporen (16—20 μ im Durchm.). Es wurde auf Hunde- und Gänsemist gefunden.

Penicillium aureum CORDA bildet gelbe, später olivengrüne Konidienrasen mit ovalen bis spindelförmigen, sehr kleinen Konidien (3 zu 1,5 μ). Die Perithecien sind zartwandig, ähnlich denen voriger Art, 50 doch von gelber Hülle aus filzig verflochtenen Hyphen umschlossen, mit ellipsoidischen, glatten, gelben Sporen (5 zu 3 μ). Es ist von CORDA auf verfaultem Holz, auf der Samenschale von *Bertholletia* durch

van Tieghem (1) beobachtet worden und im einzelnen wohl weiterer Untersuchung bedürftig. In mehreren Punkten ist es dem *P. luteum* so ähnlich, daß man beide für identisch halten könnte.

Penicillium Wortmanni Klöcker bildet Ascus-Früchte, welche nach 5 Klöcker (1) denen von *P. luteum* (und *P. aureum*) ähnlich sind. Die Ascosporen sind jedoch nicht glatt oder mit Querleisten, sondern ähnlich wie bei *P. insigne* mit stumpfen Warzen versehen. Wie sich die Art im übrigen zu diesem stellt, würde man wohl erst nach genauer Beschreibung der Konidienträger, die bislang noch aussteht, beurteilen können.

10 Das von Johan-Olsen (1) bei der Reifung von norwegischem Gammelost beobachtete *Penicillium* (als *P. aromaticum* benannt, ohne Beschreibung) ist vielleicht nur das Penicillium des Roquefort-Käses. Ebenso ist über die von Costantin und Ray (1) im Fromage de Brie beobachteten *Penicillium*-Formen, unter denen sich sicher das Camem- 15 bert-Penicillium befindet, Näheres nicht angegeben. Das *P. cupricum* Trabut's aus dem Jahre 1895 ist zufolge der Nachuntersuchung durch de Seynes eine durch das Substrat (Kupfersulfatlösung) etwas veränderte Form des gewöhnlichen „*P. glaucum*".

§ 49. Die Gattungen Citromyces und Allescheria.

20 Zur Gattung *Citromyces* Wehmer gehören nur wenige Formen, von denen einige physiologisch durch energisches Säuerungsvermögen bemerkenswert sind. Von *Penicillium* ist sie durch fehlende Verzweigung und oft blasige Anschwellung, von *Aspergillus* durch Zartheit der Konidienträger und succedane Sterigmenentwicklung verschieden. Die Blase ist 25 kugelig, keulig oder kaum angedeutet. Der Konidienträger ist hyphenartig, meist unseptiert, besonders bei älteren Exemplaren mit endständiger keuliger bis kugeliger, farbloser, dünnwandiger Blase versehen, gewöhnlich unverzweigt, schlank emporstrebend, in größerer Zahl dem einzelnen Mycelfaden aufsitzend, mit zartem, nicht von den vege- 30 tativen Hyphen verschiedenem Stiel. Die schlanken, spitz auslaufenden Sterigmen sind in wenigzähligen (5—10) Wirteln oder Büscheln scheitelwärts gerichtet, nicht divergierend sondern etwas einwärts gebogen, so daß das ganze von Konidien befreite Köpfchen Kelchform besitzt. Die Konidien sind in langen Ketten angeordnet, meist kugelig, 35 sehr klein (unter 3 μ), in Massen grün. Schlauchfrüchte sind unbekannt.

Citromyces Pfefferianus Wehmer ist makroskopisch zumal auch in der Farbe nicht von „*Penicillium glaucum*" zu unterscheiden. Er tritt als derbe, reingrüne, im Alter graugrüne bis graue und bräunliche Schimmeldecke auf sauren Früchten, Zuckerlösungen, Zuckerkonserven, Citronen- 40 saft auf, im Freien als feiner grüner Ueberzug gelegentlich auch auf alten Schwämmen (so auf *Pholiota squarrosa* u. a.). Die zarten, farblosen, 3 μ dicken Konidienträger (s. *Fig. 76*) sind kaum 70 μ hoch, dichte Rasen bildend, mit 4—8 μ dicker Blase, auf der mehrere 9—14 μ lange und ca. 3 μ dicke Sterigmen quirlig angeordnet oder minder 45 regelmäßig über die Oberfläche verteilt sind und gewöhnlich einen erheblichen Teil der Blasenwand frei lassen. Alle Teile sind zartwandig und — bis auf die kugeligen, 2.3—2.8 μ im Durchmesser haltenden Konidien — farblos. Ascusfrüchte sind unbekannt. Setzt zufolge Wehmer (6) den Zucker der Nährlösung in freie Citronensäure um; s. 50 darüber § 52 des 11. Kapitels.

Citromyces glaber Wehmer stimmt in den Hauptpunkten mit voriger Art überein. Die Schimmeldecken sind dichter verwebt und bilden reichlicher Konidien, auch etwas dunkler grün, oberflächlich fast glatt, nicht fädig-flaumig wie bei der ersten Art, unterseits dunkler, oft rissig.



Fig. 76. Citromyces Pfefferianus.
Konidienträger, bei *b—d* nach Abpräparieren der Konidienmassen, die variable Blase mit einfachen Sterigmen zeigend (*e* Mißbildung: ein zu einem neuen Träger auswachsendes Sterigma). Bei *f* Konidienträger schwächer vergrößert. *g* Hyphen des Pilzes aus kalkhaltiger Nährlösung mit ansitzenden Calciumcitratbildungen als Sphärite, Körnchen, oder als kompakte Hülle. Reife und keimende Konidien (*h*). — Vergr. von *a—e*: 400, von *f*: 240, von *g*: 400, von *h*: 600. Nach Wehmer.

Die Konidienträger mit bis 15 μ dicker Blase; Sterigmen, Konidien sind wie vorher und ohne greifbare Unterschiede. Gekochter Reis wird durch ein gelbes Pigment verfärbt. Ist zufolge Wehmer (6) gleichfalls ein Erreger von Citronensäuregärung.

Voraussichtlich existieren noch mehrere hierher gehörige, schwer unterscheidbare, nur nach kulturellem Aussehen und Verhalten unterscheidbare Spezies, auch die als *Penicillium*-Spezies in der Literatur beschriebenen Formen mit unverzweigtem Konidienträger sind anzuschließen: dahin gehört jedenfalls u. a. das alte wohl kaum noch aufklärbare *P. radians*, von Bonorden auf modernden Blättern beobachtet, sowie zwei der obengenannten Arten Oudemans' (*P. geophilum* und *P. silvaticum*), vielleicht auch das *P. radiatum* von P. Lindner (1).

Neuerdings sind von Mazé und Perrier (1) vier Arten aufgestellt worden (*Citromyces citricus*, *C. tartaricus*, *C. oxalicus*, *C. lacticus*), für die jedoch keinerlei gestaltliche Merkmale angegeben werden; sie können also nicht als Spezies im naturgeschichtlichen Sinne gelten; die beiden

Forscher fassen überhaupt den Gattungsbegriff nicht morphologisch, sondern definieren als „Citromyces“ kurzerhand irgendwelche Pilze, die Citronensäure bilden. Die Aufstellung von Gattungen nach physiologischen Merkmalen ist am allerwenigsten bei morphologisch gut definierbaren Formen zulässig, das würde auch zu einer völligen Durchbrechung unseres naturhistorischen Systems führen.

Die Gattung *Allescheria* Saccardo et Sydow ist durch sympodial verzweigte Konidienträger von *Penicillium* verschieden, übrigens durch nur eine Spezies vertreten, die früher als *Eurotiopsis Gayoni* Cost. von Costantin (1) beschrieben, auf Grund des von Karsten bereits für eine Nectroidaceen-Gattung vergebenen Genus-Namens aber als *Allescheria Gayoni* (Cost.) Sacc. et Syd. zu bezeichnen ist, übrigens wohl einmal genauer mit *Monascus purpureus* Went zu vergleichen wäre (s. § 58). Lindau (3) schlug für sie den Namen *Eurotiella* vor. Ed. Fischer (1) beschreibt sie als *Allescheria Gayoni* Saccardo et Sydow.

Allescheria Gayoni Sacc. et Syd. (= *Eurotiopsis Gayoni* Cost.) ist eine stärkeverzuckernde und diesbezüglich von Laborde (1) genauer studierte, rotes Pigment bildende Art, welche Alkoholgärung erregt und überhaupt von chemisch-physiologischem Interesse, doch praktisch bedeutungslos ist, so daß sie nur kurz erwähnt sei. Sie bildet weiße oder rötliche Schimmelrasen mit sympodial verzweigten Konidienträgern, welche lange Ketten eiförmiger Konidien abschnüren. Die Konidien sind relativ groß, 12 zu 10 μ messend. Die Schlauchfrüchte (denen von *A. glaucus* = „*Eurotium*“ ähnlich) sind kugelig, klein 50—80 μ im Durchm.), mit rundlichen, achtsporigen Ascis, deren Sporen 6 zu 4 μ messen. Auf Kleister und anderen vegetabilischen Substraten bildet sie purpurrote Flecke. Mit den bisher genannten Aspergillaceen hat die konidienbildende Form jedenfalls nur geringe Aehnlichkeit.

Literatur

zum Kapitel Morphologie und Systematik der Familie der Aspergillaceen.

*__Aderhold,__ R., (1) Landw. Jahrbücher, 1899, Bd. 28, S. 69. *__Ahlburg,__ (1) S. bei Korschelt (1). *__Altenburg,__ (1) Cit. n. Kobert (1). *__Bainier,__ (1) Bulletin Soc. mycol. de France, 1905, Bd. 21, S. 126. *__Bary, A. de,__ (1) Bot. Ztg., 1854, S. 425. — (2) Beiträge z. Morphologie u. Physiologie d. Pilze, 3. Reihe, 1870, 2. Abt., S. 18. *__Behrens,__ J., (1) Landw. Versuchsstationen, 1895, Bd. 46, S. 163. — (2) Centralbl. f. Bakt., 1892, Bd. 11, S. 110. — (3) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 514. — (4) W. f. Brauerei, 1895, Bd. 12, S. 802. — (5) Jahresber. pro 1903 der Landw. Versuchsanstalt Augustenburg, 1904, S. 43. *__Blumentritt,__ (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1901, Bd. 19, S. 442. — (2) Ebenda, 1905, Bd. 23, S. 419. *__Bodin,__ (1) Les parasites de l'Homme. Paris 1902. *__Bordas,__ (1) Comptes rend. de l'Ac., 1904, Bd. 138, S. 928. *__Bourquelot__ und __Hérissey,__ (1) Journ. de Pharm. et de Chimie, 1902, Bd. 16, S. 417. *__Brefeld,__ O., (1) Botan. Untersuchungen ü. Schimmelpilze, 4. Heft, 1881, S. 133. — (2) Desgl., 2. Heft, 1874, S. 1. *__Büsgen,__ M., (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1885, Generalvers.-Heft, S. 66. *__Butkewitsch,__ Wl., (1) Jahrb. wissensch. Bot., 1903, Bd. 38, S. 147. *__Charpentier,__ (1) Comptes rend. de l'Ac., 1905, Bd. 141, S. 367 u. 429. *__Chodat__ und __Bach,__ (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1902, Bd. 35, S. 1275. *__Cohn,__ F., (1) Jahresber. d. schles. Ges. f. vaterländische Kultur, 1883, Breslau 1884, S. 226. — (2) Ebenda, 1888, S. 156. *__Conn, Thom, Bosworth, Stocking__ und __Issajeff,__ (1) Storrs Agric. Exp. Station, Storrs, Conn., 1905, Bull. Nr. 35. *__Costantin,__ J., (1) Bull. Soc. botan. de France, 1893, S. 236. *__Costantin__ und __Lucet,__ (1) Bull. Soc. mycol. de France, 1903, Bd. 19, S. 33. — (2) Ann. des Sciences nat., Botan., 1905, 9. sér., Bd. 2, S. 119. *__Costantin__ und __Ray,__ (1) Comptes rendus de la Société de biologie, 1898, 10. sér., Bd. 5, S. 504. *__Coupin,__ (1) Comptes rend. de l'Ac., 1904, Bd. 138, S. 389. *__Coupin__ und __Friedel,__ (1) Comptes rend. de l'Ac., 1904, Bd. 138, S. 1118. *__Cramer,__ (1) Vierteljahresschrift d. Naturf. Gesellsch. Zürich, 1859, S. 325. *__Czapek,__ (1) Beitr. z. Chem. Physiologie u. Pathologie. 1902, Bd. 1, S. 538; Bd. 2, S. 557; Bd. 3, S. 62, und Ber. d.

Deutsch. Bot. Ges., 1902, Bd. 19, Generalvers.-Heft, S. 130. ***Delacroix,** (1) Bull. Soc. mycol. de France, 1891, Bd. 7, S. 107. ***Desmazières,** (1) Ann. des sc. nat., 1834, 2. sér., Bd. 2, Botan. II, S. 71. ***Dierkx,** (1) Ann. Soc. scientif. de Bruxelles, 1901, Bd. 25, Teil I. ***Duclaux,** (1) Ann. Pasteur, 1892, S. 341. ***Eidam,** (1) Beitr. z. Biol. d. Pflanz., 1883, Bd. 3, S. 377. ***Elfving,** Fr., (1) Studien ü. d. Einwirkung d. Lichtes auf d. Pilze, Helsingfors 1890. ***Emmerling,** O., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1902, Bd. 35, S. 2289. ***Engelke,** (1) Hedwigia, 1902, Bd. 41, Dezemb., Beiblatt. ***Epstein,** (1) Arch. f. Hyg., 1902, Bd. 45, S. 354. ***Fischer,** Ed., (1) In: Engler-Prantl, Nat. Pflanzenfamilien, Teil 1, Abt. 1, 1900, S. 537. ***Fresenius,** (1) Beiträge z. Mykologie, Frankfurt 1850—63. ***Friedel,** (1) Bull. Soc. Botan. de France, 1905, Bd. 52, S. 182. — (2) Ebenda, 1904, Bd. 51, S. 209, und Comptes rend. de l'Ac., 1904, Bd. 138, S. 1118. ***Garnier,** (1) Ref. in Bot. Centralbl., 1904, Bd. 95, S. 278. ***Gasperini,** G., (1) Atti Soc. Toscana Sc. Nat., Pisa 1887, Bd. 8, S. 326. ***Gosio,** B., (1) Revista d'Igiene e Sanità pubblica, 1892, S. 201 u. 261. ***Green,** (1) Die Enzyme, übersetzt von Windisch, Berlin 1901. ***Grijns,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1903, Bd. 11, S. 330. ***Guéguen,** (1) Bull. Soc. mycol. de France, 1899, Bd. 15, S. 171. — — (2) Ebenda, 1898, Bd. 14, S. 201; 1899, Bd. 15, S. 15. — (3) Les champignons parasites de l'homme et des animaux. Paris 1904. ***Harz,** C. O., (1) Sitzgsber. d. botanischen Vereins in München, 1890. ***Hatch** und **Row,** (1) The Lancet, 1900, 1. Dez. ***Hattori,** (1) Journ. College of Science Imp. Univers. Tokio, Bd. 15, S. 371. ***Heinze,** (1) Annales Mycologici, 1903, Bd. 1, S. 344, und Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 12, S. 180. ***Hennings,** P., (1) Hedwigia, 1895, Bd. 34, S. 86. — (2) Verhandl. d. Botan. Ver. d. Mark Brandenburg, 1898, Bd. 40, S. 173. ***Hiller,** (1) Proc. Indiana Acad. of science, 1901, S. 272; ref. in Bot. Centralbl., 1903, Bd. 92, S. 333. ***Höhnel,** Franz **von,** (1) Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wiss. zu Wien, Math.-naturw. Kl., 1902, Bd. 111, S. 1036. ***Inui,** (1) Journ. College of Science Tokio, 1901, Bd. 15, S. 405. ***Iwanoff,** (1) Beitr. z. chem. Physiologie u. Pathologie, 1902, Bd. 1, S. 524, und Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 13, S. 139. ***Johan-Olsen,** (1) Meddelelser fra naturh. Forening in Kristiania, 1885, S. 50. — (2) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 161. ***Jousset,** (1) Comptes rendus de la Soc. de Biologie, Paris 1903; ref. in Bot. Centralbl., 1904, Bd. 95, S. 297. ***Kanter,** (1) Ueber d. Wirkung einiger Salze d. Schwermetalle auf d. Wachstum u. chemische Zusammensetzung v. Asp. niger. Dissert., St. Petersburg 1903 (russisch). ***Klebs,** G., (1) Bedingungen d. Fortpflanzung einiger Algen u. Pilze. Jena 1896. ***Klöcker,** A., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1903, Bd. 6, S. 92; ref. in Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 12, S. 501. ***Kny,** (1) Unterrichtsblatt f. Math. u. Naturw., 1902, Nr. 1. ***Kobert,** R., (1) Lehrbuch d. Intoxikationen, 1904, Bd. 2, S. 186. ***Koernicke,** (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1904, Bd. 22, S. 163. ***Korschelt,** (1) Mitteil. d. Deutsch. Gesellsch. f. Natur- und Völkerkunde Ostasiens, 1876, Heft 16, S. 240. ***Kosinski,** (1) Jahrb. wiss. Bot., 1901, Bd. 37, S. 137. ***Kosjatschenko,** (1) Journ. f. experim. Landwirtschaft, 1903, Heft 4, S. 439 (russisch); ref. in Bot. Centralbl., 1904, Bd. 95, S. 591. ***Kostytschew,** (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1902, Bd. 20, S. 327; 1904, Bd. 22, S. 207. ***Krasnosselsky,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 13, S. 673. ***Kurzwelly,** (1) Jahrb. wiss. Bot., 1900, Bd. 38, S. 291. ***Laborde,** J., (1) Ann. Pasteur, 1897, Bd. 11, S. 1, und Comptes rendus Soc. de Biologie, 1895, S. 472. ***Lagerheim,** G. **von,** (1) Svensk Farmac. Tidskrift, 1903, Nr. 18. ***Lendner,** (1) Bulletin de l'Herbier Boissier, 1903, 3. sér., Bd. 3, S. 362. ***Lesage,** P., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1902; ref. in Bot. Centralbl., 1902, Bd. 89, S. 87, und 1903, Bd. 92, S. 94. ***Lindau,** G., (1) Hedwigia, 1904, Bd. 43, S. 306. — (2) Hyphomycetes in Rabenhorsts Kryptogamenflora Deutschlands, 2. Aufl., 1904, 1. Bd., 8. Abt. — (3) In: Engler-Prantl, Natürl. Pflanzenfamilien, 1900, Teil 1, Abt. 1, S. 383 u. 416. ***Lindner,** P., (1) Mikroskopische Betriebskontrolle in d. Gärungsgewerben, 3. Aufl., 1901, S. 314 u. 317—319, und Atlas d. mikroskopischen Grundlagen d. Gärungskunde, Berlin 1903, Tafel 33 u. 35. ***Linossier,** G., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1891, Bd. 112, S. 489 u. 807. ***Lode,** (1) Arch. f. Hyg., 1902, Bd. 42, S. 107. ***Loew,** E., (1) Jahrb. wiss. Bot., 1869—70, Bd. 7, S. 472. ***Lucet,** (1) De l'Aspergillus fumigatus chez les animaux. Paris 1899. ***Lutz,** (1) Bull. Soc. mycol. de France, 1905, Bd. 21, S. 131. ***Mac Alpine,** (1) Agricult. Gazette of N. S. Wales, 1896, Mai. ***Macé,** (1) Arch. de Parasitologie, 1903, Bd. 7, S. 313; auch als Thèse de Médecine Paris 1903: Etudes sur les Mycoses experimentales. ***Maximow,** (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1904, Bd. 22, S. 225. ***Mazé** und **Perrier,** (1) Ann. Pasteur, 1904, Bd. 18, S. 553. ***Meissner,** E., (1) Akkomodationsfähigkeit einiger Schimmelpilze. Dissert., Leipzig 1903. ***Meissner,** R., (1) Weinlaube, 1903, S. 521. — (2) Bot. Ztg., 2. Abt., 1897, Bd. 55, S. 337. ***Milburn,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 13, S. 268. ***Mirsky,** (1) Sur quelques causes d'erreur dans la détermination des Aspergillées parasites de l'homme. Thèse. Nancy 1903. ***Molisch,** H., (1) Die Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen. Jena 1892. ***Molliard** und **Coupin,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1903, Bd. 136, S. 1695. ***Morini,** (1) Malpighia,

1888/89, Bd. 2, S. 224. ***Müller-Thurgau,** H., (1) Ber. ü. d. Verhandl. d. 11. Deutsch. Weinbaukongresses in Trier, Mainz 1889, S. 87. — (2) Bericht ü. d. Verhandl. d. 12. D. Weinbaukongresses in Worms, Mainz 1891, S. 129. ***Nomura,** (1) Bot Magazine Tokyo, 1897, Bd. 11, Nr. 123, S. 31. ***Ono,** N., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 9, S. 154. ***Orlowski,** (1) Wirkung des Arsens auf Wachstum u. chemische Zusammensetzung von Asp. niger. Dissert., St. Petersburg 1902 (russisch); ref. in Bot. Centralbl., 1904, Bd. 95, S. 302. ***Oudemans,** (1) Nederl. Kruidk. Arch., 1886, 2. Ser., Bd. 4, S. 535. — (2) Arch. Néerlandaises des sciences exactes et natur., 1902, 2. sér., Bd. 7, S. 288 u. f. — (3) Ebenda, S. 283. — (4) Nederl. Kruidk. Arch., 1904, 2. Ser., Bd. 2, Suppl. 4, S. 1123. ***Pammel, Weems** und **Lawson-Scribner,** (1) Jowa geological Survey, 1901. ***Pantanelli,** (1) Jahrb. wiss. Bot., 1904, Bd. 40, S. 303. ***Patouillard** und **Delacroix,** (1) Bull. Soc. mycol. de France, 1891, Bd. 7, S. 118. ***Porodko,** (1) Jahrb. wiss. Bot., 1904, Bd. 41, S. 1. ***Puriewitsch,** K., (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1895, Bd. 13, S. 339. — (2) Schriften d. Gesellsch. d. Naturforscher in Kiew, 1899, Bd. 16. ***Raciborski.** M., (1) Cryptogamae parasiticae in insula Java lectae exsiccatae, Buitenzorg 1899, fasc. II. — (2) Bull. Acad. Sciences de Cracovie, Cl. des Sc. math. et nat., 1905, S. 693. ***Raux,** G., (1) Cit. n. Nomura (1). ***Reichardt,** (1) Verhandl. d. Zool.-Botan. Gesellsch. in Wien, 1867, Bd. 17, S. 335. ***Rénon,** (1) Étude sur l'aspergillose chez les animaux et chez l'homme. Paris 1897. ***Richter,** (1) Ref. in Botan. Centralbl., 1902, Bd. 89, S. 621. ***Roger,** (1) Fabrication des fromages de Brie etc., Communication faite à la Société de l'Agricult. de Meaux, 1898. ***Roze,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1897, Bd. 125, S. 982. ***Saccardo,** P., (1) Michelia, II, S. 547; Fungi italici, Tab. 893, und Sylloge fungorum hucusque cognitorum, 1886, Bd. 4, S. 85. — (2) Zusammenstellung der Penicillium-Spezies in Sylloge fungorum etc., Bd. 4, S. 78, Bd. 10, S. 527, Bd. 11, S. 513, u. d. Aspergilleen in Bd. 1, S. 25 (Eurotium), Bd. 4, S. 64, Bd. 10, S. 524, u. Bd. 11, S. 591. ***Saida,** (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 1902, Bd. 19, Generalversammlungs-Heft, S. 107. ***Saito,** (1) Journal of Science College Tokyo, 1904, Bd. 18, Art. 5. ***Savoff,** (1) Recherches sur l'aspergillose pulmonaire. Thèse. Nancy 1905. ***Savouré,** (1) Arch. de Parasitologie, 1905; ref. in Bot. Centralbl., 1906, Bd. 101, S. 11. ***Schröter,** (1) In Rabenhorsts Kryptogamenflora Schlesiens, III. Band Pilze. 2. Hälfte, 2. Lief., S. 220. ***Siebenmann,** (1) Die Fadenpilze Aspergillus und Eurotium, 1882; 2. Aufl. als „Die Schimmelmykosen des menschlichen Ohres", Wiesbaden 1889. ***Spieckermann** und **Bremer,** (1) Landw. Jahrbücher, 1901, Bd. 31, S. 81. ***Stoll,** O., (1) Beiträge z. morpholog. u. biolog. Charakteristik v. Penicilliumarten. Dissert., Würzburg 1904. ***Thom,** (1) Journ. of Mycology, 1905, S. 117. — (2) Bull. Bureau of Animal Industry U. St. Departm. Agricult., 1906. ***van Tieghem,** Ph., (1) Ann. des sciences natur., Bot., 1867, Bd. 8, S. 240. — (2) Bull. Soc. Botan. de France, 1877, Bd. 24, S. 96 u. f. ***Tiraboschi,** (1) Annali di Botanica, 1905, Bd. 2, Heft 1, S. 137. ***Todur,** (1) Contribution à l'étude de l'action des sels inorganiques et organiques d'argent sur diverses espèces d'Aspergillus. Thèse. Nancy 1905. ***Trabut,** (1) Bull. Soc. Botan. de France, 1895, Bd. 42, S. 33. ***Tribondeau,** (1) Comptes rendus Soc. de Biologie de Bordeaux, 1901, Bd. 53; 1903, Bd. 55, S. 104. ***Vorderman,** (1) Geneesk. Tijdschrift voor Nederl. Indië, 1894, Bd. 34, Nr. 5. ***Vuillemin,** P., (1) Arch. de Parasitologie, 1904, Bd. 8, S. 540. — (2) Comptes rend. de l'Ac., 1904, Bd. 138, S. 1350. ***Wehmer,** C., (1) Chem.-Ztg., 1902, Bd. 26, Nr. 22. — (2) Die Pilzgattung Aspergillus, Genf 1901. — (3) Centralbl. f. Bakt., 1. Abt., 1903, Bd. 35, S. 140. — (4) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1896, Bd. 2, S. 140. — (5) Ebenda, 1895, Bd. 1, S. 150. — (6) Beiträge z. Kenntnis einheimischer Pilze, 1893, Heft 1, S. 70. — (7) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1893, Bd. 11, S. 499. — (8) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1897, Bd. 3, S. 149. — (9) Hedwigia, 1894, Bd. 33, S. 211. — (10) Beiträge z. Kenntnis einheimischer Pilze, 1896, Heft 2, S. 73—77. — (11) Ebenda, S. 68. — (12) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1904, Bd. 22, S. 476; s. auch (8). ***Went,** C., (1) Annales des Sciences natur., Botanique, 1896, 7. sér., Bd. 1. ***Wilhelm,** C., (1) Beiträge z. Kenntnis d. Pilzgattung Aspergillus. Straßburger Dissert., Berlin 1877, S. 36, und Bot. Ztg., 1881, Bd. 39, S. 534. ***Winter,** G., (1) In Rabenhorsts Kryptogamenflora Deutschlands, 2. Aufl., 1887, Bd. 1, 2. Abt., S. 48 u. 61. ***Zimmermann,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 218. — (2) Ebenda, 1901, Bd. 7, S. 923. ***Zschokke,** A., (1) Ueber d. Bau d. Haut u. die Ursachen d. verschiedenen Haltbarkeit unserer Kernobstfrüchte. Dissert., Bern 1897, S. 21 u. 23. ***Zukal,** H., (1) Oester. Botan. Zeitschr., 1893, Nr. 5. — (2) Sitzungsber. d. Kais. Akadem. d. Wiss. zu Wien, Math.-naturw. Kl., 1. Abt., 1887, Bd. 96, Nov.-Heft. — (3) Ebenda, 1889, 1. Abt., Bd. 98, S. 561.

(*Manuskript-Einlauf:* 4. *Jan.* 1906.)

11. Kapitel.

Chemische Wirkungen der Aspergillaceen.

Von Prof. Dr. C. Wehmer.

§ 50. Uebersicht.

Aus der Physiologie der Aspergillaceen sollen in diesem Kapitel einige chemische Wirkungen gesondert behandelt werden. Gerade in chemischer Beziehung sind manche Vertreter derselben bemerkenswert und auch oft Gegenstand der Untersuchung gewesen. An anderen Stellen des Handbuches ist darauf bereits mehrfach näher eingegangen worden, für uns bleibt hier also im ganzen nur die Aufgabe einer kurzen zusammenfassenden Darstellung dieser Tatsachen zur Charakterisierung der Familie auch in dieser Beziehung.

Bei allen darauf untersuchten Arten ist die Gegenwart von Enzymen als Trägern zersetzender Wirkungen konstatiert worden; ihre Zahl scheint noch fortdauernd zu wachsen, fast sämtliche überhaupt bekannte Enzyme findet man bei den Aspergillaceen vereinigt. Spaltung insbesondere von Kohlenhydraten (Disacchariden und Polysacchariden) Glycosiden, Fetten und Eiweißkörpern durch Invertase (Invertin) Maltase, Lactase, Amylase (Diastase), Inulase, Cellulase (Cytase), Pektinase, Melecitase, Raffinase, Emulsin, Lipase, Protease u. a. sind bekannt, auch Labenzym, Amidase, Tannase, sowie oxydierende und reduzierende Enzyme sind angegeben. Ganz besonders sind *Aspergillus niger* und die Sammelspezies „*Penicillium glaucum*" als Versuchsobjekt zu diesen Untersuchungen herangezogen worden; aber auch über *A. Oryzae*, *A. Wentii*, *A. glaucus*, *Penic. luteum* und vereinzelt über andere Aspergilleen und Penicillien, sowie endlich über *Allescheria Gayoni* (= *Eurotiopsis Gayoni*) liegen derartige Beobachtungen vor. Durch die Unbestimmtheit dessen, was den Autoren als „*Penic. glaucum*" vorlag, wird der Wert aller hierher gehörigen Resultate leider erheblich beeinflußt. Nur in wenigen Fällen sind freilich die bezüglichen Enzyme bislang in Substanz isoliert worden, gewöhnlich wurde ihr Vorhandensein durch Reaktionen mit der Kulturflüssigkeit oder auch Extrakten der zerriebenen Schimmeldecken nachgewiesen.

Neben den enzymatischen finden wir eigentliche Gärwirkungen im engeren Sinne nur bei wenigen Arten. Ausgeprägtere Alkoholgärung ist bislang nur von einer (*Allescheria Gayoni*) bekannt, Oxydationsgärungen dagegen bei mehreren, und zwar Oxalsäuregärung bei *Asp. niger*, Citronensäuregärung bei *Citromyces Pfefferianus*, *Citr. glaber* und *Penicillium luteum*. Ob diese Vorgänge vom lebenden Pilz trennbar und auch durch die tote Substanz hervorzurufen sind, wurde bislang nicht untersucht.

Die Spaltung racemischer Verbindungen in ihre optisch-aktiven Komponenten durch Mikroorganismen ist bereits im 15. Kapitel des I. Bandes besprochen worden. Die Tatsache selbst sei nur angeführt, weil fast alle diese Feststellungen gerade mit Aspergillaceen, vor allem *Asp. niger* und „*Penicillium glaucum*", wenn auch wohl öfter von zweifel-

hafter Reinheit und Zugehörigkeit gemacht sind. Einige Experimentatoren arbeiteten auch mit *Asp. flavescens* (soll wohl *A. flavus* sein) und *A. griseus*, ein Name, unter dem sich vielleicht eine bekanntere Spezies (etwa *A. fumigatus* Fres.) verbirgt. Leider sind Beschreibungen der Pilze nicht gegeben, so daß solche Resultate bedauerlicherweise so gut wie in der Luft schweben. Daß das *Penicillium glaucum* zumal älterer Arbeiten eine unkontrollierbare Spezies und nur als Kollektivbezeichnung für grüne Schimmeldecken zweifelhafter Natur zu verstehen ist, wurde schon auf S. 223 u. f. hervorgehoben.

Gering sind unsere Kenntnisse noch über die von mehreren Arten erzeugten Farbstoffe und deren Bildungsbedingungen. Gleiches gilt für die von pathogenen Arten gebildeten Gifte, indes die minder wichtige zersetzende Wirkung mehrerer Spezies auf leichter oxydable Substanzen (Alkohole, organische Säuren) wiederholt verfolgt ist. Fast durchweg sind die Aeußerungen des Chemismus unserer Pilze an Gegenwart von Luft-Sauerstoff gebunden, untergetauchte Vegetation wird nur widerwillig, völliger Sauerstoffabschluß aber selbst bei Darbietung von Zucker nur kurze Zeit ertragen. Weitere Orientierung über diese Prozesse findet der Leser in den Werken von Pfeffer (3) und Duclaux (1), den Vorlesungen über Pflanzenphysiologie von Jost (1) sowie der vor kurzem erschienenen Biochemie der Pflanzen von Czapek (1).

§ 51. Stärkeverzuckerung.

Wir stellen das diastatische als das praktisch wichtigste Vermögen der Aspergillaceen mit Recht in den Vordergrund. Von altersher wurde es technisch ausgenutzt, die Diastase speziell des japanischen *Aspergillus Oryzae* ist von geschichtlichem Interesse, sie war das erste besser bekannt gewordene Fadenpilz-Enzym und eröffnet somit die lange Reihe der hauptsächlich im Verlauf der letzten beiden Dezennien des verflossenen Jahrhunderts bei Pilzen aufgefundenen Enzyme. Im Jahre 1860 isolierte Berthelot das Invertin der Hefe; daß der Auszug von „Schimmelpilzen" Rohrzucker invertiert, teilte Béchamp im Jahre 1864 mit. Nach Gayon's Beobachtung der invertierenden Wirkung von *Asp. niger* im Jahre 1878 folgten dann die weiteren Arbeiten über diese Pilze erst in den achtziger Jahren.

Im Jahre 1876 spricht sich Korschelt (1) in der von ihm zuerst gegebenen ausführlichen Darstellung der in Japan üblichen Reisverzuckerung (s. Bd. V, S. 245) durch *Asp. Oryzae* nicht bloß klar darüber aus, daß dieser Pilz in seinen Hyphen eine die Stärke in Dextrin und Maltose überführende Diastase erzeugt, sondern er versuchte auch bereits, das Wirkungs-Optimum (40—50°) des von ihm nach *Eurotium Oryzae*, dem früheren Namen des Pilzes) Eurotin genannten, der Malzdiastase sehr ähnlichen Enzyms zu bestimmen. Hiernach sind auch Angaben der Literatur, die späteren Forschern die Auffindung dieser Diastase zuschreiben, so bei Oppenheimer (1), richtig zu stellen. Vom Anfang der achtziger Jahre an beschäftigt sich dann eine Mehrzahl von Forschern mit demselben: Atkinson im Jahre 1881, F. Cohn im Jahre 1883, Büsgen im Jahre 1885, Kellner, Mori und Nagaoka im Jahre 1889; dann folgte von 1889 ab der Versuch Takamine's zur Nutzbarmachung der Aspergillus-Wirkung außerhalb seines Vaterlandes (s. S. 146) und die weiteren bis heute fortgesetzten Arbeiten über die

Aspergillus-Diastase („Takadiastase") und ihre Leistungsfähigkeit zumal auch im Vergleich zu gleichen Enzymen anderer Herkunft. Auf diese Punkte ist in den von der technischen Verwendung derselben handelnden Paragraphen des 13. Kapitels des V. Bandes zurückzukommen. Uebrigens sei hier vorweg bemerkt, daß in dem Extrakt von *Asp. Oryzae* bezw. von Koji nicht nur eine Amylase sondern ein Gemenge verschiedener Enzyme vorliegt, die seit ATKINSON, der als Verzuckerungsprodukt Dextrose nachwies, bekannten verschiedenartigen Wirkungen (Spaltung von Rohrzucker, Maltose u. a.) also nicht auf das eine Enzym zu beziehen sind.

Die verzuckernde Wirkung auf Stärke, welche durch eine passende Mischung verschiedener Stoffe (Phosphate, Aluminiumsalz, Asparagin u. a.) zufolge EFFRONT (1) gesteigert werden soll, wird schon durch geringere Mengen von Alkohol oder Kochsalz störend beeinflußt, aber erst durch 20—30 Proz. völlig unterdrückt; vergl. Bd. I, S. 263. 2 Proz. Kochsalz setzten die Wirkung des Enzymgemenges nach KELLNER, MORI und NAGAOKA (1) schon auf 50.2—58.3 Proz. herab, 20 Proz. Salz auf unter 10 Proz. der ursprünglichen, 2 Proz. Alkohol gleichfalls auf 82 Proz., solcher von 10 Proz. zufolge KOZAI (1) auf 50 Proz. und von 28 Proz. auf 1 Proz. der ursprünglichen. Auch freie Säuren (Milchsäure, Salzsäure) wirkten schon unter 1 Proz. völlig hemmend. Für die technische Verwendung des Pilzes bei der Reiswein-, Soya- und Miso-Darstellung spielen diese Punkte eine beachtenswerte Rolle.

Asp. Oryzae ist keineswegs die einzige amylolytisch wirkende Art dieser Familie, dasselbe Vermögen scheint vielmehr den meisten, wenn auch anscheinend in schwächerem Grade, zuzukommen. Soweit die Spezies darauf untersucht sind, erwies sich Stärkekleister (mit den üblichen sonstigen Nährstoffen) für alle als geeignetes Substrat, seine Verarbeitung setzt also das Gegebensein entsprechender Enzyme voraus; einer Aufzählung aller Spezies bedarf es demnach kaum. Derartige Beobachtungen beginnen mit dem Jahre 1883 durch DUCLAUX (1); sie betreffen zunächst *Asp. niger*, weiterhin dann *A. glaucus*, „*Penicillium glaucum*" sowie *Allescheria Gayoni* (= *Eurotiopsis Gayoni*) durch FERNBACH (1), BOURQUELOT, HEBEBRAND (1), LABORDE (1), WEHMER (5). Beobachtungen über das Verzuckerungsvermögen von Deckenauszügen sind neuerdings von SCHÄFFER (1) für eine Mehrzahl von Spezies (*Aspergillus niger*, *A. Wentii*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. Oryzae*, *Penicillium glaucum*, *P. luteum*, *P. italicum*, *P. rubrum*) mitgeteilt worden.

Aus den Kulturen bezw. Decken von *Asp. niger* stellten FERNBACH (2) und BOURQUELOT die schon von DUCLAUX (3) erwähnte Amylase (Diastase) dar; ersterer konstatierte auch, daß das durch Alkoholfällung gewonnene Präparat schon durch geringe Mengen freier organischer wie anorganischer Säuren in seiner Wirksamkeit merklich gestört wird. Es mag das auch die Erscheinung erklären, daß die Verflüssigung von Stärkekleister-Kulturen dieses freie Oxalsäure abspaltenden Pilzes zufolge WEHMER (5) mehrfach unvollständig bleibt. Uebrigens korrodiert und löst derselbe nach DUCLAUX (3) vermittels einer von der gewöhnlichen verschiedenen Maltase auch rohe Stärke unter Dextrose-Auftreten. Nach LABORDE (1) soll überhaupt das betreffende Enzym („Amylomaltase") sowohl von *Asp. niger* wie von *Penicillium glaucum* und *Allescheria Gayoni* die Stärke direkt in Dextrin und Dextrose überführen, also nicht wie die Malzdiastase Maltose bilden, die es im übrigen gleichfalls zu hydrolysieren vermag. Es ist nach der (freilich nicht unwidersprochen gebliebenen)

Meinung dieses Forschers die „Amylomaltase" aber nicht bloß von der Maltase des Gerstenmalzes verschieden, sondern derselbe folgert aus dem verschiedenen Verhalten der Amylomaltasen dieser drei Pilze gegen äußere Einflüsse (Einwirkung von Säuren, Optimum und Maximum der 5 Wirkung) auch auf die Verschiedenheit untereinander, ein wohl noch weiterer Untersuchungen bedürftiger Punkt. *Penicillium* wie *Aspergillus* bilden zufolge PETIT (1) jedenfalls das bei der Malzverzuckerung entstehende Dextrin ($C_6 H_{10} O_5)_3$ auch in Dextrose um. Ueber die Diastase des ersteren siehe auch HEBEBRAND (1). Stärkeverzuckernd wirkt zufolge 10 GOSIO (2) auch *Penicillium brevicaule*.

Ueber die Bildungs-Bedingungen der Diastase von *Asp. niger* und *Pen. glaucum* vergleiche man Bd. I, S. 363. Die Fortdauer der Amylase-Ausscheidung bei Kultur des *Asp niger* auf Zuckerlösung war im Jahre 1889 schon von DUCLAUX, aber ohne näheren Beweis, behauptet 15 worden, wie denn die Arbeit dieses Forschers, so fruchtbar sie auch war, für die zahlreichen neuen Angaben leider keinerlei experimentelle Belege bringt.

§ 52. Säuregärungen.

Bildung freier organischer Säuren — und nur auf diesen Vorgang 20 wenden wir die Bezeichnung „Säuregärung" an — ist bei den Aspergillaceen im Gegensatz zu den zahlreichen enzymatischen Wirkungen eine seltene Erscheinung; immerhin sind sie bislang die einzige Eumyceten-familie, bei der dieser Vorgang in ähnlicher Weise wie bei Bakterien schön zutage tritt. Wie hier insbesondere Essigsäure, Buttersäure und 25 Milchsäure, so sind bei den Eumyceten Oxalsäure und Citronensäure Produkte der Säuregärung. Gleichartige Vorgänge liefern bei Phanerogamen bekanntlich vorzugsweise Citronensäure, Weinsäure oder Aepfelsäure. Immer ist die Anhäufung solcher Säuren in einer auffälligen Menge, ob sie nun in der Vakuole der höheren Pflanze oder in der Nährlösung 30 von Mikroorganismen statthat, Ausdruck einer nur bestimmten Arten oder Familien (Aurantiaceen, Crassulaceen, Vitaceen u. a.) zukommenden physiologischen Eigentümlichkeit, deren nähere Analyse keineswegs leicht ist. Für die Mehrzahl der Fälle ist die freie organische Säure nur ein vorübergehend vorhandenes (intermediäres) Produkt, das weiterhin 35 durch völlige Oxydation zersetzt wird; die Frage, ob nun die Phase ihrer Entstehung zu schnell, oder die der Weiterzersetzung zu träge verlief, bleibt zunächst eine offene. Das Vorkommen von Salzen organischer Säuren, wie solche allgemein verbreitet, fällt naturgemäß nicht ohne weiteres unter den Begriff Säuregärung, solche setzen die Präexistenz 40 freier Säuren nicht notwendig voraus, sind vielmehr häufig erst Folge des Disponibelwerdens von Basen im Stoffumsatz; vergl. Bd. I, S. 317—318.

Voraussichtlich stehen wir in der Frage der Säuregärungen erst im Anfang unserer Kenntnisse; man wird bei planmäßig fortgesetztem Experimentieren sowohl noch weitere Pilze wie auch andere Säuren 45 auffinden, welche bei derartigen Prozessen erzeugt werden. Schon heute liegen einige dahingehende weitere aber noch unvollständige Angaben vor. So säuert auch *Asp. Oryzae* zuckerhaltige Nährlösungen an, ohne daß die Natur der Säure ermittelt ist; in einer 28-tägigen Kultur auf Würze bestimmte GRAF (1) die Acidität zu 40 ccm Zehntelnormal-Baryt-50 lauge auf 20 ccm Kulturflüssigkeit, während „*Penicillium glaucum*" nur

2,45 ccm, *Asp. niger* allerdings sogar 56,6 ccm Lauge auf die gleiche Menge Kulturflüssigkeit brauchte. Das für *Asp. niger* und „*Penic. glaucum*“ von LIND (1) gezeigte Durchfressen feiner Kalkplatten (vergl. Bd. I, S. 471) kommt, wie bei calciumoxalatreichen Flechten, wenigstens teilweise auf Rechnung solcher Säuren.

Daß es sich in Kulturen von *Asp. Oryzae* nach SANGUINETI (1) um Ameisensäure und Essigsäure handelt, ist wenig wahrscheinlich und wäre für reine Kulturen wenigstens noch zu erweisen, ebenso die von HEINZE (1) behauptete Essigsäurebildung durch *Asp. niger*. Auch die Angabe, daß ein als *Lactomyces* bezeichneter zweifelhafter Pilz Zuckerlösungen auf Milchsäure vergärt, muß einstweilen und trotz des auch vom Kaiserl. Deutschen Patentamte darauf erteilten Patentes Nr. 118063 vom 26. Febr. 1901 als unbewiesen und unwahrscheinlich betrachtet werden, zumal Milchsäure-Bildung bislang von keinem Hyphenpilz bekannt geworden ist. Gleicher Meinung ist mit Recht CZAPEK (1). Ueber die Ansäuerung der Kulturflüssigkeiten durch einige Mucorineen ist das 22. Kapitel des vorliegenden Bandes zu vergleichen. Von Aspergillaceen kommen als erklärte Bildner freier organischer Säuren zunächst *Asp. niger*, *Penicillium luteum* und zwei *Citromyces*-Arten in Frage; bei dem ersten handelt es sich um Oxalsäure, bei den drei letzteren um Citronensäure.

Die **Oxalsäuregärung** ist in ausgesprochener Weise bislang allein bei *Aspergillus niger* beobachtet worden, nur andeutungsweise finden wir sie auch bei *Asp. glaucus*, *Penicillium glaucum* sowie einigen Nicht-Aspergillaceen (*Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus nigricans*), wo die spurenweis überschießende freie Säure nur bei sofortiger Neutralisation der Weiterzersetzung entgeht; aber auch in anderen Gruppen des Pflanzenreiches begegnet man der Abspaltung freier Oxalsäure im Stoffwechsel, die selbst als solche persistieren kann (*Rheum*-, auch wohl *Oxalis*-Arten), gewöhnlich aber durch das mit dem Bodenwasser zugeführte Calciumkarbonat zu sofortiger Ablagerung gebracht wird (Cacteen, Knospen und Rinden vieler Holzgewächse, Flechten). Daß wir den Vorgang bei den Pilzen als „Gärung“ bezeichnen, ändert nichts an seiner Gleichartigkeit in allen diesen Fällen; selbstverständlich haben wir ihn aber nicht mit der Entstehung von Oxalaten schlechthin zusammenzuwerfen.

Das bloße Vorkommen von Calciumoxalatkristallen bei Pilzen ist lange bekannt, zumal in Kulturen vom *Asp. niger* öfter beobachtet worden, so auch von SCHRÖTER (1) schon angegeben. Ihre Entstehung in Gelatinekulturen von *Penicillium glaucum* erwähnt AD. HANSEN (1) im Jahre 1889, in Sklerotien desselben Pilzes auch BREFELD im Jahre 1874. Auf die Bildung löslicher Oxalate durch *Sclerotinia sclerotiorum* wies A. DE BARY (1) hin. DUCLAUX (3) erwähnt im Jahre 1889 beiläufig und ohne experimentelle Belege die Entstehung von Oxalsäure bezw. Oxalaten in Kulturen von *Asp. niger* auf verschiedenen Substraten. ZOPF (1) fand im Jahre 1889 Oxalatkristalle bei Kultur einer Hefenart sowie später von verschiedenen Essigbakterien in Pepton-Zuckerlösungen mit Gelatine-Zusatz; ausführliche Beobachtungen darüber teilte BANNING (1) mit. Den Nachweis, daß Oxalsäure in freiem Zustande lediglich bei Darbietung von Kohlenhydraten oder chemisch verwandten Substanzen von Pilzen, und zumal dem *Asp. niger*, ausgeschieden wird, führte WEHMER (5) im Jahre 1892; gleichzeitig wurde hier versucht, die bislang bekannt gewordenen Tatsachen unter einen allgemeinen Gesichtspunkt

zu bringen, auch die im Schwunge befindlichen Hypothesen über Beziehungen des Oxalsäure-Auftretens zur Eiweißbildung zu widerlegen. Diese Ermittlungen führten dann zu einer Reihe bestimmter Feststellungen über die Oxalsäuregärung dieses Pilzes, welche diesen Prozeß 5 anderen Gärungen unmittelbar an die Seite stellen. Wir gelangen so nach WEHMER (3, 4, 5) zu ungefähr folgendem Bilde desselben.

Bald nach Entwicklung der aus Sporenaussat hervorgehenden Decke beginnt die Nährlösung des in Reinkultur bei Zimmertemperatur gezogenen *Aspergillus*, rotes Congopapier zu bläuen und mit Calciumkarbonat 10 Gas zu entwickeln: zwei untrüglichen Reaktionen für Gegenwart einer freien Säure. Allmählich steigt die Acidität auf ein Maximum, nimmt dann im Laufe der nächsten Wochen wieder ab und sinkt bei fortgesetzter Kulturdauer schließlich auf Null zurück; am Ende tritt sogar alkalische Reaktion ein. Die Fähigkeit des Pilzes zur Zerstörung freier Säure 15 läßt sich auch durch Auflegen fertiger Decken auf verdünnte Oxalsäure-Lösungen (mit bis 0,5 Proz. kristallisierter Säure direkt zeigen. Die Grenze der Säureansammlung liegt im Mittel bei ca. 0,2 Proz. des Flüssigkeitsvolumens; ohne Einfluß ist, ob viel oder wenig Zucker geboten wird, wesentlich sind aber die allgemeinen Bedingungen.

20 Die Ansäuerung ist zunächst von dem gebotenen organischen Nährstoffe abhängig; sie findet nur bei Darbietung von Zuckerarten und chemisch ähnlichen Substanzen, nicht dagegen bei Verwendung von Salzen organischer Säuren, Amiden, Pepton statt, obschon hier reichlich oxalsaure Salze entstehen. Gleichzeitig entscheiden darüber aber auch 25 etwa vorhandene anorganische Stoffe, zumal die Stickstoffquelle des wachsenden Pilzes; denn trotz Zuckergegenwart bleibt bei Darbietung von Salmiak oder Ammoniumsulfat an Stelle von Kalium-, Calcium- oder Ammoniumnitrat die Säureabspaltung aus und kann selbst durch Zusatz jener zu sonst säuernden Kulturen unterdrückt werden. Eine 30 wichtige Rolle spielt von vornherein aber die Temperatur: sie ist geradezu für den Erfolg entscheidend: niedere Wärmegrade begünstigen, höhere verhindern die Säureansammlung, so daß beim Wachstumsoptimum des Pilzes (gegen ca. 37°) die Ansäuerung ausbleibt, wenige Grade über dem Wachstumsminimum (ca. 7°) aber den höchsten Wert 35 erreicht (bis gegen 1 Proz.). Der Pilz vermag tatsächlich bei höheren Wärmegraden ihm gebotene freie Oxalsäure und selbst noch bei 0,4 Proz. weit leichter zu zerstören, die Anhäufung bei niederer Temperatur kann also nur Folge verzögerter Oxydation, also geschwächter oxydativer Wirkung, sein. Aus allem ergibt sich aber klar, daß nicht — wie gern 40 angenommen wurde — relativer Sauerstoffmangel für die Entstehung von Oxalsäure in Frage kommen kann: denn mit Rücksicht auf Sauerstoffzutritt sind die Pilzdecken in allen diesen Versuchen ganz gleich gestellt, und sie kann nur in dem Sinne als Produkt einer unvollständigen Oxydation aufgefaßt werden, daß diese Oxydation eben 45 durch irgend welche störenden Momente anderer Art verhindert wurde.

Bemerkenswert ist der Effekt, welchen der Zusatz von säurebindenden Salzen auf den Vorgang ausübt. Es kommt so zu einer successiven Anhäufung der festgelegten Oxalsäure, die schließlich ganz außerordentliche Werte erreicht; das resultierende Calciumoxalat kann 50 über 100 Proz. des ursprünglich vorhandenen Zuckers ausmachen, so daß aus 15 g Zucker ca. 10 g an Oxalsäure (wasserfrei) entstehen, wofür nach Berechnung nahezu 7 g desselben mit Beschlag belegt werden, ohne daß dadurch die Pilzernte beeinträchtigt wird. So erzeugte der Pilz

aus 1.5 g Traubenzucker bei Kreidezusatz und 15—20° allmählich folgende Calciumoxalatmengen:

Nach	11	Tagen	0,282 g	Nach	72	Tagen	1,340 g
„	16	„	0,570 „	„	100	„	1,642 „
„	27	„	0,650 „	„	120	„	1,615 „
„	46	„	1.122 „	„	247	„	1,730 „

Ohne Kreidezusatz konnte aus ganz der gleichen Nährlösung dagegen nur gefällt werden:

Nach	9	Tagen	0,005 g	Nach	66	Tagen	0,298 g
„	16	„	0,070 „	„	78	„	0,130 „
„	23	„	0,170 „	„	97	„	0,103 „
„	46	„	0,255 „	„	120	„	0,018 „
„	54	„	0,248 „	„	175	„	0,014 „

und bei höherer Temperatur 34—35° ergaben sich bei sonst gleicher Versuchsanstellung überhaupt nur Spuren von Oxalat:

Nach	4	Tagen	0,000 g	Nach	32	Tagen	Spur
„	8	„	0,0[illegible]8 „	„	42	„	„
„	15	„	0,028 „	„	68	„	0,068 g
„	18	„	0,000 „				

indes bei der Temperatur von 7—9° ohne Kreide auch nach ca. 7 Monaten noch 0.624—0.820 g gefunden wurden, und bei Kreidezusatz selbst bei der Versuchstemperatur von 34—35° sich aus der gleichen Zuckermenge (1.5 g) an Calciumoxalat 1.122 g (nach 46 Tagen) und 1.340 g (nach 72 Tagen) gebildet hatten.

Es bedarf bei diesem physiologisch interessanten Pilz aber nicht einmal einer Festlegung der Säure als unlösliches Salz, um sie seiner weiteren Wirkung zu entziehen, sondern es reichen dafür auch lösliche säurebindende Salze, wie alkalisch reagierende Alkaliphosphate, und selbst neutrale Alkalioxalate aus, wobei letztere in saure Oxalate übergehen; offenbar beruht hierauf auch das Vorkommen gerade von sauren oxalsauren Alkalisalzen bei Phanerogamen (*Oxalis* u. a.). Demgegenüber ist es wieder von Interesse zu sehen, daß *Penicillium glaucum* freie Säure wie Alkalioxalate ungleich leichter zerstört als *Aspergillus*, also schon aus diesem Grunde kein besonderer Säuerungserreger sein kann.

Wenn auch gewöhnlich derartige mit *Asp. niger* angestellte Versuche fast mit der Sicherheit eines chemischen Experiments verlaufen, so sind individuelle Abweichungen doch nicht ausgeschlossen. Auf solche ist es auch wohl zurückzuführen, wenn nach einigen Feststellungen Wehmer's (9) wie Emmerling's (1) gelegentlich Säuerung ganz ausbleibt. Auch andere Momente können da vielleicht mitwirken, denn schon Zusatz einer Spur von Eisensalzen zu am Licht wachsenden Kulturen vermag nach früheren Feststellungen Wehmer's (7) die Wiederzerstörung der Säure zu begünstigen. Hinweise auf die Oxalsäurebildung durch *A. niger* finden sich übrigens auch in einigen neueren Arbeiten, die an anderen Stellen dieses Buches (vergl. Bd. I. S. 318) erwähnt sind. Ausgeschlossen haben wir hier bei unserer Besprechung selbstverständlich diejenigen Fälle, wo durch Freiwerden von Basen im Stoffwechselchemismus die Oxalsäurebildung reguliert wird (so bei Verarbeitung von Salzen anderer organischer Säuren, von Amiden, Pepton, Gelatine u. a.); hier entsteht keine überschüssige freie Säure sondern oxalsaure Salze, dieser auch von der Temperatur unabhängige Vorgang ist anderer Art, ohne die freiwerdende Basis würde Säure sich nicht ansammeln. Auf diese Fälle von Oxalsäureentstehung beziehen sich manche frühere oder spätere Arbeiten der Literatur, wo die Forscher, wie Zopf (1), Banning (1) u. a.,

unter Zusatz von Amiden, Pepton, Fleischextrakt, Gelatine zu den Nährlösungen — also nicht mit bloßen Zuckerlösungen und Mineralsalzen — arbeiteten; die chemische Natur dieser Substanzen schreibt bei lebhaft oxydierenden Organismen von vornherein Entstehung von Oxalaten oder 5 Karbonaten vor. Bislang hat der *Asp. niger* weder unter den Hyphenpilzen noch unter den Hefen oder Bakterien einen Konkurrenten mit gleich ausgesprochener Eigentümlichkeit gefunden.

Eine im Jahre 1905 von CHARPENTIER (1), dem die bisherige Literatur inhaltlich leider durchaus fremd ist, veröffentlichte Arbeit über die 10 Oxalsäure-Bildung des *Asp. niger* wiederholt nur längst Bekanntes. Wenn sie daraufhin aber zu dem sonderbaren Schlusse kommt, daß die Säurebildung Folge der Erschöpfung des Nährbodens sei, so bedarf diese Verkennung des wirklichen Sachverhalts im Ernst keiner Widerlegung. Nach HEINZE (1) soll neben der Oxalsäure auch Essigsäure gebildet 15 werden, was jedenfalls für reine Kulturen noch genaueren Nachweises bedürfte; im Hinblick auf die leichte Zersetzbarkeit dieser Säure durch unseren Pilz, worüber PFEFFER (2) sowie DUCLAUX (3) berichten, ist das freilich nicht sehr wahrscheinlich, auch nicht näher belegt. Daß übrigens in den drei Versuchen HEINZE's mit dem doppelten und dreifachen 20 Volumen Nährlösung entsprechend mehr an Oxalsäure vorhanden war als in nur 200 ccm ist natürlich Folge der Regulation der Säurebildung — wie das schon WEHMER betonte — und nicht Wirkung des geringen Stickstoffgehalts. Daß HEINZE diesen Pilz aus Pepton, Gelatine u. a. auch Salpeter bilden läßt, macht seine gesamten Angaben etwas 25 unglaubwürdig. Die kurzen Angaben von KOSTYTSCHEW (1) über Säurebildung bei der intramolekularen Atmung des *Aspergillus* sind zu allgemein gehalten, um daraus schon bestimmte Schlüsse zu ziehen.

Die **Citronensäuregärung** stellt sich der besprochenen Oxalsäuregärung unmittelbar an die Seite; wir haben auch darunter nur die Ab- 30 scheidung freier Citronensäure, nicht kurzweg die bei Phanerogamen und Pilzen allgemein verbreitete Bildung citronensaurer Salze zu verstehen. Ihre Erreger finden unter den Phanerogamen ein Seitenstück in den *Citrus*-Arten, gleichwie *Aspergillus niger* physiologisch den *Oxalis*-, *Rumex*- und *Rheum*-Arten nahestand. Wir haben uns hier in kurzen 35 Zügen mit Chemismus, Bedingungen und Verlauf des Prozesses, wie er nach den Angaben WEHMER's (7) zumal bei *Citromyces Pfefferianus* und *Citr. glaber* beobachtet wird, zu beschäftigen. Auch *Penicillium luteum* ist (gleichwie *Mucor piriformis*) zufolge WEHMER (8) ein freilich schwächerer Säurebildner.

40 Als Oxydationsgärung ist der Vorgang in gleichem Maße wie die Essig- und Oxalsäuregärung von der Gegenwart reichlicher Sauerstoffmengen abhängig. Bei Luftabschluß kommen überhaupt weder *Aspergillus*- noch *Citromyces*-Sporen zur Entwicklung; selbst die fertigen Decken ertragen Luftabschluß nur kurze Zeit. Trotzdem auch die Citronensäure 45 als das Produkt einer unvollständigen Oxydation anzusehen ist, so ist ihre Entstehung doch auch hier nicht Folge ungenügenden Sauerstoffzutritts sondern einer aus irgend welchen anderen Gründen unterbleibenden Zersetzung. Allerdings scheint da nicht die Temperatur in gleichem Maße wie bei der Oxalsäuregärung ausschlaggebend zu sein, 50 und es bedarf zur völligen Klärung noch weiterer Ermittlungen, um die Abhängigkeit des Prozesses von äußeren Bedingungen ganz klar zu legen. Vorbedingung ist übrigens auch hier der chemische Charakter des organischen Nährstoffes, nur Kohlenhydrate oder ähnliche Substanzen,

nicht Pepton, Amide, Salze organischer Säuren etc., ermöglichen Abspaltung freier Säure.

Die ohne sichtbare Gasentbindung verlaufende, beginnende Ansäuerung offenbart sich durch Blaufärbung von Congopapier; mit Kreide braust die Nährlösung jetzt lebhaft auf. Allmählich steigt die Acidität und erreicht bei ungefähr 8 Proz. freier Säure ihre Grenze, ohne die Pilzentwicklung sichtbar zu beeinflussen. Jetzt beginnt der Pilz, die angesammelte Säure wieder zu zersetzen, die Acidität fällt, und nach einigen weiteren Wochen ist jede Spur freier Säure verschwunden; zweifellos ist diese also ein intermediäres und nur für den Augenblick der Weiterzerstörung entgangenes Produkt. Die Wirkung seiner Festlegung in Salzform ist auch hier die erwartete, durch Neutralisation wird die Säure vor Wiederzerstörung geschützt; gleichzeitig wird die Abspaltung beschleunigt und die Gesamtmenge erheblich vermehrt. Während also bei Fehlen von Kreide die Acidität nur langsam wächst, kommt es bei Zusatz derselben zu der säuernden Kultur alsbald zu einer lebhaften tagelang andauernden Gasentbindung, weit auffälliger als bei der Oxalsäuregärung, und nach kurzem von einer starken Calciumcitratabscheidung gefolgt.

Von dem unveränderten Calciumkarbonat wird das Citrat durch Lösen in Salzsäure, Neutralisieren durch Ammoniak und Aufkochen — wobei nur Citrat ausfällt — getrennt, und schließlich trocken bei 110° gewogen, so daß sich die Ausbeute fast quantitativ feststellen läßt. Man erhält so durchschnittlich ein Drittel bis zur Hälfte des angewandten Zuckers an kristallisierter Säure (mit 1 Molekül Wasser), die in bekannter Weise durch verdünnte Schwefelsäure aus dem Kalksalz frei gemacht und nach Abfiltrieren des Gipses und Einengen zur Kristallisation gestellt wird. In gut verlaufenden Versuchen wird also nahezu die Hälfte des Zuckers in Citronensäure umgewandelt, ohne daß dadurch die Pilzentwicklung merklich gestört wird; *Asp. niger* vermag, wie wir sahen, gleichfalls ungefähr die Hälfte des Zuckers (Dextrose) auf Oxalsäure zu verarbeiten, wobei die resultierende Säuremenge mehr als drei Viertel des Zuckergewichts betragen konnte.

$$\underset{\substack{180 \\ \text{Dextrose}}}{C_6H_{12}O_6} + O_3 = \underset{\substack{192 \\ \text{Citronensäure}}}{C_6H_8O_7} + 2H_2O. \quad (+1 \text{ Molek. } H_2O = 210)$$

$$\underset{\substack{180 \\ \text{Dextrose}}}{C_6H_{12}O_6} + O_9 = \underset{\substack{270 \\ \text{Oxalsäure}}}{3C_2H_2O_4} + 3H_2O. \quad (+2 \text{ Molek. } H_2O = 306)$$

Immerhin wird in beiden Fällen noch rund die Hälfte des Gärmaterials für die Bedürfnisse des Pilzes verbraucht; es fragt sich allerdings, ob Abänderung der Versuchsbedingungen die Zahlen nicht weiter zugunsten des Produkts verschieben könnte. Das entstehende Calciumcitrat bleibt zunächst in der Kulturflüssigkeit gelöst, erst bei anwachsender Konzentration scheidet es sich gutenteils in zusammenhängenden, aus Nadeln- und Körnchenkonkrementen bestehenden, voluminösen Krusten am Boden der Gefäße ab; in der bereits erwähnten Weise aus heißer Lösung gefällt, hat es die Zusammensetzung $(C_6H_5O_7)_2Ca_3 + 4H_2O$, enthält also rund drei Viertel seines Gewichts an kristallisierter Säure $(C_6H_8O_7 + H_2O)$, die frei von Nebenprodukten in reinem Zustande gewonnen wird.

Es erübrigt sich, auf die technische Bedeutung eines derartigen Verfahrens zur Darstellung von Citronensäure hinzuweisen; der

Marktpreis der Säure bewegt sich um 250 M. pro 100 kg, der des Rohmaterials beträgt kaum ein Zehntel davon. Immerhin liegen in der Art der erforderlichen Apparate zur Herstellung großer Säuremengen sowie der Infektionsgefahr und der Variabilität des Gärvermögens gewisse Schwierigkeiten, deren die Fabrikpraxis bislang schwer Herr werden konnte. Lange Zeit haben sich die „Fabriques de Produits Chimiques" zu Thann und Mülhausen unter SCHEURER-KESTNER's Leitung mit diesen Fragen beschäftigt.

Einen kurzen Hinweis verdient noch der Chemismus des Vorganges. Bei dem Uebergang von Zucker (Dextrose) in Citronensäure handelt es sich nicht um eine glatte Oxydation sondern um gleichzeitige Spaltung der normalen Kohlenstoffkette des Zuckermoleküls; der Formel der Säure entsprechend rückt das eine Kohlenstoffatom in seitliche Bindung:

$$\begin{array}{l} COOH \\ CH_2 \\ COH \cdot COOH \\ CH_2 \\ COOH \\ \text{Citronensäure} \end{array} \qquad\qquad \begin{array}{l} COH \\ CH \cdot OH \\ CH \cdot OH \\ CH \cdot OH \\ CH \cdot OH \\ CH_2OH \\ \text{Dextrose} \end{array}$$

Der Prozeß erscheint deshalb im Gegensatz zu anderen Gärungen komplizierter; trotz wiederholter derartiger Behauptungen in der Literatur läßt sich die Säure bislang auch nicht durch einfache Oxydation von Zucker erhalten.

Auf eine etwaige biologische Bedeutung solcher Säuregärungen einzugehen, ist wenig dankbar, sie erklärt auch nichts. Wenn sich für die Oxalsäuregärung noch geltend machen ließ, daß durch die sich ansammelnde Säure Konkurrenten um die Nahrung stärker beeinträchtigt werden, so hat das für die Citronensäure kaum noch Gültigkeit. Im Beginn der Vegetation, wo sie von Nutzen wäre, fehlt in beiden Fällen die Säure, und wo sie späterhin reichlich vorhanden ist, hat sie keinen Wert mehr, da der Pilz das Substrat ohnedies bereits voll besetzt hat; überdies stört die Ansammlung ihn selbst, und schließlich sagen citronensaure Flüssigkeiten auch gerade einigen bestimmten anderen Pilzen zu. Ungleich wichtiger erscheint die Frage, ob der Organismus durch die mit der Ansammlung verbundene Materialvergeudung nicht selbst benachteiligt wird, wie das ja sicher z. B. bei der alkoholischen Gärung offenkundig der Fall ist. Für die Oxalsäuregärung scheint das nicht zuzutreffen, aber auch für die Citronensäuregärung ist das nach WEHMER (7) trotz des erheblicheren physiologischen Wertes dieser Säure jedenfalls nicht in die Augen fallend und wohl nur durch genauere quantitative Ermittelungen festzustellen. Im allgemeinen darf man aber behaupten, daß im Interesse des Organismus — wenn man hier nun einmal von Zweckmäßigkeitsgründen sprechen will — derartige Gärungen am besten unterblieben; sie entsprechen einer mehr oder minder unökonomischen Nutzung des Substrats.

Neuerdings haben sich MAZÉ und PERRIER (1) noch mit der Citronensäurebildung beschäftigt. Sie beobachteten sie nach Angabe auch aus Alkohol oder Glycerin und führen ihre Entstehung auf eintretenden Stickstoffmangel in der Kultur zurück, lassen sie aber von Anwesenheit oder Fehlen des Sauerstoff unabhängig sein. Die Säure soll das Produkt eines „Desassimilationsprozesses" bei Erschöpfung des Substrats an

assimilierbarem Stickstoff sein; ihrer Entstehung soll eine Spaltung des Zuckers in Alkohol und Kohlensäure voraufgehen. Es wäre vielleicht nicht schwer, diese Annahmen experimentell zu widerlegen; MAZÉ und PERRIER scheinen nur mit einer vorläufigen Mitteilung (10), aber nicht mit der ausführlichen Arbeit WEHMER's (7) bekannt zu sein. 5

§ 53. Spaltung von Disacchariden und Trisacchariden, Glycosiden und Polysacchariden (ausschl. Stärke).

Einige Jahre vor der diastatischen wurde zunächst die invertierende Wirkung von Aspergillaceen festgestellt. Nach der Invertin-Auffindung folgte dann die Erkenntnis der zahlreichen weiteren Enzyme, bislang 10 vorwiegend festgestellt bei den beiden Hauptversuchspilzen *Asp. niger* und *Pen. glaucum*, letzteres stets als Sammelname einander sehr ähnlicher nicht näher identifizierter Formen.

Asp. niger spaltet bis auf den noch zweifelhaften Milchzucker sämtliche hierher gehörige Zuckerarten vor dem Verbrauch, erzeugt also 15 Invertin (Invertase, Sucrase), Maltase, Trehalase, Melecitase (?) Raffinase, wie das vom Jahre 1878 ab durch eine ganze Reihe von Arbeiten durch GAYON (1), DUCLAUX (3), FERNBACH (3), BOURQUELOT, HÉRISSEY, GILLOT (1) festgestellt worden ist. Zumal hat BOURQUELOT allein und in Gemeinschaft mit seinen Mitarbeitern (HÉRISSEY, GRAZIANI) 20 sich wiederholt mit diesen Enzymen beschäftigt und ihre Kenntnisse wesentlich erweitert. Die erste Angabe über Inversion des Rohrzuckers durch den Pilz scheint aus dem Jahre 1878 und zwar von GAYON (1) zu stammen, seit 1883 durch DUCLAUX ist die Frage dann wiederholt behandelt worden; übrigens ist nach FERNBACH, der im 25 Jahre 1890 das Enzym nachwies, auch den nachteiligen Einfluß des Lichtes auf seine Wirkung beobachtete, die Invertin-Entstehung nicht von Rohrzucker-Gegenwart in der Kulturflüssigkeit abhängig. Im Jahre 1893 wurde es von BOURQUELOT studiert. In Gemeinschaft mit HÉRISSEY (1) zeigte BOURQUELOT im Jahre 1896 die enzymatische 30 Spaltung des Trisaccharids Melecitose in Dextrose und Turanose, ein der Maltose ähnliches Disaccharid, welch letzteres zwar durch Säuren aber nicht durch den Pilz weiter verändert wird. Derselbe Forscher gewann im Jahre 1893 auch durch Alkoholfällung ein die Trehalose zu 2 Molekülen Dextrose hydrolysierendes, von Invertin und Maltase 35 verschiedenes Enzym (Trehalase), das freilich nach E. FISCHER (2) auch mit der gleiches leistenden Amylase identisch sein könnte, und zeigte endlich die enzymatische Maltose- und Raffinose-Spaltung (5), — letztere durch ein besonderes Enzym bewirkt — sowie (6) zum Teil in Gemeinschaft mit HÉRISSEY (3) die des Trisaccharids Gentianose 40 in Dextrose (2 Molek.) und Lävulose nach intermediärer Bildung von Gentiobiose (in 2 Moleküle Dextrose spaltbar) neben Lävulose (Invertin, Emulsin.) Ueber die Raffinase sind die Ansichten allerdings noch geteilt, andere wollten ihr nur die Melibiose-Spaltung (die „Melibiase“ von BAU) in Galactose und Dextrose zuschreiben, die Umwandlung der Melitriose 45 in Melibiose und Dextrose aber durch Invertin bewirken lassen. Nach E. FISCHER ähnelt sie sehr der Maltase. Auch die Melecitase ist vielleicht Maltase. Uebrigens sollen nach BOURQUELOT (8) Gentiobiose wie Turanose gleichfalls durch spezifische Enzyme spaltbar sein. Mit der Maltase-Wirkung beschäftigte sich HÉRISSEY (1), mit der Raffinose- 50

Zersetzung — immer durch eben denselben Pilz — auch GILLOT (1). Es existiert also allein über die zuckerspaltenden Enzyme des *Asp. niger* schon eine ansehnliche Literatur.

Ganz ähnlich verhält sich „*Penicillium glaucum*“, für das bis heute Invertin (DUCLAUX 1883), Maltase und Trehalase, Raffinase bereits nachgewiesen sind, die ersten von 1880 ab zumal durch BOURQUELOT (5), die letzte 1900 durch GILLOT (1): das Wirkungsoptimum seiner Maltase soll um 30° niedriger liegen (45°) als das derjenigen von *Aspergillus* (BOURQUELOT). Die schon 1864 von BÉCHAMP (1) gemachte Beobachtung über Invertierung von Rohrzucker durch das Filtrat zerquetschter Schimmelpilze bezieht sich wohl auf „*P. glaucum*“.

Bei dem Rohrzucker invertierenden *Penicillium Duclauxii* (vielleicht identisch mit *P. luteum*) wurde ein Invertin in der Kulturflüssigkeit nicht ermittelt (BOURQUELOT und GRAZIANI [1]), es wird also wohl vom Mycel zurückgehalten.

Lange bekannt ist das invertierende Vermögen des *A. Oryzae* (ATKINSON 1881, KELLNER, MORI und NAGAOKA 1889), der sowohl Rohrzucker wie Malzzucker, doch nicht Milchzucker, enzymatisch spaltet, nach Meinung KOZAI's (1) auch Raffinose (Melitriose) abbaut. Nach heutiger Auffassung können wir diese Wirkungen nicht mehr einem einzigen Enzym (Eurotin und Invertase der früheren Untersucher) zusprechen (s. S. 240), wie denn auch schon KELLNER die Frage nach der einheitlichen Natur der „Invertase“ noch offen ließ. Milchsäure wirkte in geringen Mengen (0,05 Proz.) begünstigend, bei 0,1 Proz. aber schon schwächend und bei 0,6—0,7 Proz. ganz hemmend auf die Rohrzuckerspaltung, schon bei 0,5 Proz. ging die Wirkung auf ca. $^1/_5$ zurück; vergl. KELLNER, MORI und NAGAOKA (1). Die Wirkung von Alkohol und Kochsalz dürfte wohl der auf die Amylase ungefähr gleichkommen.

Eine Sonderstellung nimmt *Allescheria Gayoni* (= *Eurotiopsis G.*) insofern ein, als hier Lactase vorhanden ist, aber Invertin fehlt; außerdem konnten hier im Jahre 1897 Maltase und Trehalase nachgewiesen werden (LABORDE [1]). Bei der Vergärung von Invertzuckerlösungen wurde Lävulose merklich schneller als Dextrose angegriffen. Dies ist aber bislang der einzige Pilz der Familie, welcher nachweislich den Milchzucker vor dem Verbrauch enzymatisch spaltet, und es fragte sich doch, ob nicht auch *A. niger* und *P. glaucum* gleiches tun; diskutiert, doch nicht erwiesen wurde der Punkt schon 1889 von DUCLAUX (3). Auch neuere Versuche SCHÄFFER's (1) lieferten kein bestimmtes Resultat, wenngleich derselbe bei *A. niger*, *A. Oryzae* und *P. glaucum* eine schwache Wirkung auf den Milchzucker konstatiert zu haben glaubt. Uebrigens fand derselbe, daß Rohrzuckerlösung durch Deckenauszüge aller untersuchten Aspergilleen (*A. Wentii*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. Oryzae*, *A. niger*) und Penicillien (*P. luteum*, *P. rubrum*, *P. italicum*, *P. glaucum*) invertiert wird, mindestens verhält sich der Milchzucker also doch ungleich resistenter. Maltose wird nach demselben durch Extrakte der genannten Pilze in Glucose umgewandelt.

Auch über die **Glycosidspaltung** liegen schon viele Feststellungen vor. Emulsin-Bildung ist von *Asp. niger*, *A. Oryzae*, *A. fumigatus*, *A. Wentii*, *Penic. luteum*, *P. rubrum*, *P. italicum*, *P. glaucum* und *Allescheria Gayoni* angegeben. Aus *Asp. niger* gewann es BOURQUELOT (1) im Jahre 1893 und studierte zum Teil in Gemeinschaft mit HÉRISSEY (2) sein Verhalten gegen mehrere Glycoside: Amygdalin, Salicin, Coniferin, Helicin, Populin, Arbutin, Aesculin wurden durch den Auszug der Pilz-

decke gespalten, unwirksam war er auf Digitalin, Solanin, Hesperidin, Convallamarin, Jalapin u. a.; gleiche Wirkung hat der mit Alkohol aus dem im Vacuum konzentrierten Auszug gefällte Niederschlag. HÉRISSEY (2) verglich es noch genauer mit dem Mandelemulsin. Gegen dieses zeigt es bestimmte Verschiedenheiten, zumal wurden Populin und Phloridzin nur von dem *Aspergillus*-Emulsin (in Benzoylsaligenin bezw. Phloretin) gespalten. Von den anderen Enzymen dieses Pilzes war es allerdings nicht trennbar. Nach GÉRARD (2) erzeugt auch *Penic. glaucum* ein durch Auslaugen des Pilzes darstellbares, emulsinartig wirkendes, Amygdalin und Salicin spaltendes Enzym. *Asp. glaucus* entspricht in seinem Verhalten gegen Glycosidlösungen dem der beiden eben genannten Pilze. Alle drei, als lebende Decke angewandt, wurden auch von PURIEWITSCH (1 u. 2) einer Untersuchung (s. Bd. I, S. 360) unterworfen. Auf Helicin-Lösung starb die Pilzdecke unter Einfluß des entstehenden Salicylaldehyds ab, aus Salicin wurde Saligenin abgespalten, die Dextrose von dem Pilz aber sofort verbraucht; ähnlich verhielten sich Arbutin, Coniferin, Aesculin, Hesperidin, Phloridzin. Die Amygdalinspaltung in Dextrose, Benzaldehyd und Blausäure konnte nur durch Auszüge oder nach Aetherisieren des Pilzes beobachtet werden, die lebende Pilzdecke erzeugt weder Benzaldehyd noch Blausäure, so daß hier die Spaltung wohl anders verläuft: der Verfasser vermutete, daß durch ein invertinartiges Enzym Zersetzung in Zucker und Amygdalinsäure stattfände, was freilich nicht zutrifft (s. unten). Unterdrückt wurde die Enzymbildung durch Zugabe größerer Zuckermengen, die also ähnlich wie bei der Diastasewirkung auf Stärke die Spaltung der Glycoside verhindern. In *Penic. luteum* fand J. BEHRENS (1) Emulsin, auch Quercitrin spaltet dieser Pilz. Nach LABORDE (1) findet durch *Allescheria Gayoni* (= *Eurotiopsis Gayoni*) übrigens die Glycosidspaltung (Amygdalin, Salicin, Coniferin) auch bei lebendem Versuchsmaterial unter Auftreten von Zucker statt. Von den Resultaten PURIEWITSCH's weichen die von BRUNSTEIN (1) im Jahre 1901 erhaltenen etwas ab; hier wurden *Asp. niger*, *A. Oryzae*, *A. Wentii*, *A. glaucus* und *Penic. glaucum* gegen Helicin, Salicin, Arbutin Amygdalin, Coniferin, Myrosin, Saponin, Glycyrhicin geprüft; mit Ausnahme des zweifelhaften Myrosins werden alle durch die Schimmeldecke gespalten. *Asp. glaucus* wie *Asp. Wentii* spalteten Helicin ohne Auftreten von Salicylaldehyd, es entstand vielmehr Salicylsäure; *Asp. niger*, *Asp. Oryzae* und *Penic. glaucum* bildeten Salicylaldehyd, der von *Asp. Oryzae* u. a. zu Salicylsäure oxydiert wird. Mehrfach wird diese von den Pilzen (*Asp. Wentii* insbesondere) weiter verbraucht. Das aus Arbutin gebildete Hydrochinon wirkte dagegen giftig. Amygdalin wurde aber von allen Arten in Zucker und Cyanhydrin, das sekundär unter Abspaltung von Ammoniak zu Mandelsäure oxydiert wird, gespalten. Die Tatsache der Amygdalin- und Helicin-Spaltung durch den lebenden Pilz, wie besonders durch Deckenextrakte, ist auch von SCHÄFFER (1) im selben Jahre (1901) für eine größere Zahl von Pilzen festgestellt worden; außer *Asp. niger*, *A. Wentii*, *A. glaucus*, *A. Oryzae* und *Penic. glaucum* wirkten *Asp. fumigatus*, *Penic. luteum*, *Penic. rubrum* sowie *Penic. italicum* in derselben Weise; auch hier wurde myronsaures Kali nicht angegriffen. Was übrigens HÉRISSEY (3) bei dem als *Asp. fuscus* BONORDEN bezeichneten Pilz mit gleicher Wirkung unter Händen hatte, läßt sich nicht ersehen; die alte BONORDEN'sche Beschreibung reicht zu einer Wiedererkennung nicht aus.

Auch die **Spaltung von Polysacchariden** ist schon untersucht. Das

Vorkommen eines das Inulin spaltenden Enzyms ist im Jahre 1893 von BOURQUELOT (1) bei *Asp. niger* und *Penic. glaucum* festgestellt worden; bei *Asp. Oryzae* fehlt es nach KELLNER, MORI und NAGAOKA (1), ebenso nach LABORDE (1) bei *Allescheria*, die jedoch aus Gummi arabicum redu-
5 zierenden Zucker bildet. Genauer hat sich neuerdings DEAN (1) mit seinem Vorkommen in *Penic. glaucum* und *Asp. niger* beschäftigt. Spontan tritt es aus den Hyphen nicht heraus, zählt also zu den Endoenzymen; selbst in ganz geringen Mengen wirken Alkali wie Säuren schon schädlich, 55° C wird als das Optimum für seine Wirkung angegeben. Uebrigens
10 gibt SCHÄFFER (1) an, daß Inulase auch bei *Asp. Oryzae*, überdies bei *A. Wentii*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *Penic. luteum*, *P. rubrum*, *P. glaucum* und *P. italicum* sich findet. Enzymatische Lösung von „echter" Cellulose scheint dagegen in der ganzen Familie nur selten vorzukommen; MIYOSHI (1) sah zwar Durchbrechung von Zell-
15 wänden, wenn die Hyphen von *Penicillium* chemotaktisch gereizt werden, sie erfolgte jedoch mit Hilfe mechanischen Drucks (vergl. Bd. I, S. 471). Auch J. BEHRENS (1) konstatierte die Unfähigkeit Cellulose aufzulösen bei *Penic. glaucum* und *P. luteum*, doch vermochten diese beiden die Substanz der Mittellamelle in Lösung zu bringen, sie bilden
20 also — wie übrigens auch *Asp. niger* — Pektinase. Von zwei Arten, *Asp. Oryzae* und *Asp. Wentii*, wird angegeben, daß sie weich gekochte Reiskörner und Sojabohnen durchwachsen, zumal soll der letztere nach PRINSEN-GEERLIGS (1) dabei die Zellhäute durchdringen und auflösen, so den Inhalt freilegend. Es handelt sich da aber nicht um echte
25 Cellulose, und so bliebe die Art der Enzyme wohl noch näher festzustellen. Für *Asp. Oryzae* ist auch sonst die Erzeugung von Cytase (= Cellulase) durch NEWCOMBE (1) sowie OKAMURA und TAKAKUSU (1) direkt angegeben worden. Da aber die Wände des Gerstenendosperms, welche wenigstens NEWCOMBE mit dem Enzymgemenge von *Asp. Oryzae*
30 (der „Takadiastase") prüfte, nur aus einer schon von der Malzamylase leicht angreifbaren Hemicellulose bestehen (REINITZER), so ist das gleichfalls nicht beweisend; die Wände wurden hier sogar vor der Stärke gelöst, diese in ca. 8—12 Tagen, erstere aber bereits binnen 24 Stunden. OPPENHEIMER (1) läßt dies als Celluloselösung gelten, die er gleichfalls
35 durch *Penic. glaucum* (nach MIYOSHI als Gewährsmann) zustande kommen läßt; MIYOSHI fand aber gerade das Gegenteil. Eine sehr geringfügige Einwirkung von *Asp. niger* auf Fließpapier scheint übrigens VAN ITERSON konstatiert zu haben; vergl. dazu Bd. III, S. 263.

Die **Gallussäuregärung** des Tannins (Tanningärung), welches als
40 Glycosid galt, wird nach VAN TIEGHEM's (1) Angaben aus dem Jahre 1867 durch zwei Schimmelpilze (*Asp. niger* und *Penic. glaucum*) bewirkt. Später zeigten dann FERNBACH (1) und gleichzeitig POTTEVIN (1), daß *Asp. niger* entgegen der Meinung VAN TIEGHEM's, — demzufolge die Spaltung des Tannins in Gallussäure und Glucose eine „wahre Gärungs-
45 erscheinung", d. h. mit den Lebenserscheinungen zusammenhängt, und nicht die Wirkung einer von dem Pilzmycel sezernierten Substanz ist — ein das Tannin (= Digallussäure) spaltendes Enzym (Tannase) ausscheidet, welches durch Alkohol fällbar und für sich in steriler Lösung aus reinem Tannin 98,7 Proz. Gallussäure bildet. In Kulturen scheidet
50 sich die schwerlösliche Gallussäure in feinen Kriställchen aus der Tanninlösung ab. Uebrigens wird das Verfahren fabrikmäßig zur Gallussäure-Darstellung ausgenutzt; vergl. D. R. P. 13187 vom Jahre 1901. Die aus dem gewöhnlichen Handelstannin neben Gallussäure durch

van Tieghem beobachtete Dextrose (12—15 Proz.) ist also kein Spaltungsprodukt eines Glycosids sondern Verunreinigung. Auch die Tannase entsteht nur bei Kultur auf tanninhaltigem Substrat, ihr Wirkungsoptimum liegt bei ca. 67°; sie spaltet ebenfalls Tannate sowie Phenyl- und Methylsalicylat. Dasselbe Enzym wirkt also wohl bei der Gallussäureentstehung im fermentierenden Rauchopium mit (Opiumgärung), denn auch hier soll, nach Calmette (1), der *Asp. niger* als Hauptbeteiligter das Tannin spalten, überdies bei der 10—12 Monate langen Gärung den im Opium enthaltenen Zucker zu Dextrose invertieren, die, wie auch das Dextrin, zu Calciumoxalat oxydiert wird, ohne daß dabei die Alkaloide angegriffen werden. Bekanntlich ist *Asp. niger* ein Pilz, der mit Vorliebe saure Substrate aufsucht (Lösungen organischer Säuren) und hier gut gedeiht, auch auf Galläpfeln und deren Auszügen vorkommt, sein spontanes Auftreten bei der Tannin- und Opiumgärung ist also wohl verständlich. In der Hauptsache dürften bei der Tanninspaltung durch spontan sich entwickelnde Schimmeldecken allerdings grüne noch näher zu studierende *Penicillium*-Arten beteiligt sein. Uebrigens ist die Gallussäuregärung des Tannins der Galläpfel schon lange vor van Tieghem auf „organisierte Fermente" zurückgeführt worden; Laroque (1) sprach im Jahre 1850 diesem „Ferment" auch die Fähigkeit, Alkoholgärung einzuleiten, zu, unterschied also die verschiedenen Organismen nicht. Andererseits ließ Robiquet (1) im Jahre 1852 jene Gärung durch ein Enzym der Galläpfel selbst (Pektase), das auch Pektose in Pektin verwandeln sollte, zustande kommen. Demgegenüber bedeutet die spätere Meinung van Tieghem's offenbar wieder einen Rückschritt; die allmähliche Wandlung der Ansichten in dieser Frage ist aber nicht ohne Interesse. —

Aus „*Penic. glaucum*" wurde im Jahre 1897 von Camus (1) in geringer Menge ein fettverseifendes Enzym extrahiert. Der Extrakt von *Asp. niger* ergab demselben (2) nur sehr schwache Wirkung; übrigens ist *Asp. niger* gerade ein auf gewissen Fetten (z. B. Olivenöl mit Nährsalzen) üppig gedeihender Pilz. Auch Gérard (1) wies im Jahre 1897 nach dem von Harriot und Camus (1) angegebenen Verfahren Lipase in *Penicillium* nach, stellte auch fest, daß das Emulsin dieses Pilzes keine fettspaltende Wirkung hat. Daß man das Enzym des *Penicillium*, welches energisch spaltend auf Butterfett wirkt, durch Zerreiben der Hyphen gewinnen kann, zeigte auch Lana (1) im Jahre 1902. *Aspergillus*-Arten (*A. glaucus*, *A. flavus*) wirken nach Bremer (1) auf das Fett des Baumwollsaatöles langsam spaltend. *Allescheria* (= *Eurotiopsis*) zersetzt nach Laborde (1) gleichfalls Oel und Butterfett unter Ansäurung lebhaft. Lipase in den Kulturen von *Asp. fumigatus*, *A. flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. versicolor* (hier besonders reichlich) gibt Garnier (1) an. In betreff der Spaltung des Butterfettes im besonderen vergleiche man dazu die Angaben auf S. 215 des II. Bandes.

§ 54. Alkoholbildung.

Alkoholische Gärung in irgendwie ins Auge fallendem Grade finden wir mit einer Ausnahme bei keiner Aspergillacee. Für einige Arten ist zwar die Bildung von Alkohol angegeben, die Mengen sind aber, sofern die Sache nicht überhaupt zweifelhaft ist, recht gering; so gibt Sanguineti (1) für *Asp. Oryzae* Alkoholbildung aus Rohrzucker, Stärke,

Dextrin an (bis 4 Gew.-Proz. in 10 Tagen). Hiernach müßte allerdings — wovon bislang nichts bekannt ist — auch *Asp. Oryzae,* der unter Gärungserscheinungen aus 50 g Rohrzucker in 10 Tagen 20 g Alkohol (4 Gew.-Proz.) gebildet haben soll, als ausgesprochener Gärungserreger
5 angesehen werden; der vereinzelte, von Sanguineti angestellte Versuch scheint aber doch der Bestätigung zu bedürfen. Nach Pasteur (1) soll auch *Asp. glaucus* in Würze untergetaucht — dagegen nicht frei an der Luft — Kohlensäure und Alkohol bilden (ca. 1 Proz.), wobei die Mycelien in kürzere abgerundete Zellen zerfallen; auch in Kulturflüssigkeiten von
10 *Penic. glaucum* sollen so geringe Mengen Alkohol entstehen. Gleiches gilt zufolge Gosio (2) für *Penic. brevicaule.* Für *Asp. glaucus, Asp. niger* und *Penic. glaucum* ist das allerdings bestritten, ob mit Recht, steht dahin, wenn auch die Angabe von Elfving (1) der bis 4.2 Proz. Alkohol in Kulturen von „*Penic. glaucum*" gefunden haben will, etwas fremdartig
15 erscheint. Die Möglichkeit, daß dieser Stoff in Pilzkulturen verbreiteter ist, als wir zurzeit annehmen, ist nicht von der Hand zu weisen, und bedürfte einmal näheren Verfolgs; vielleicht entging derselbe deshalb bislang der Beobachtung, weil die Decken mehrerer Arten nachgewiesenermaßen (vergl. Bd. I, S. 421) Aethylalkohol leicht zersetzen, *Eurotiopsis*
20 zufolge Laborde sogar bis 10 Proz. und *Asp. niger* zufolge Duclaux bis 6—8 Proz., diese Substanz in 3-proz. Lösung (neben mineralischen Nährstoffen) überhaupt ein geeigneter Nährstoff für *Asp. niger* und *Penic. glaucum* ist; vergl. Wehmer (5), ebenso Coupin (1). Sofern die Art also nicht unter beschränktem Luftzutritt gezüchtet werden kann — was
25 gewöhnlich nicht der Fall ist — muß immer mit einer schnellen, die Anhäufung verhindernden Weiterzersetzung (Oxydation) desselben gerechnet werden. Mazé (1) will den Alkohol als regelmäßiges (normales) Zwischenprodukt bei Verarbeitung von Zucker ansehen und erörtert das im Jahre 1902 speziell an Versuchen mit *Allescheria Gayoni* (= *Eurotiopsis*).
30 Die oben angedeutete Ausnahme macht nun zufolge Laborde (1) die *Allescheria Gayoni* (= *Eurotiopsis*). Dieser Pilz erregt in Lösungen von Dextrose, Lävulose, Maltose und selbst Lactose, und zwar nach vorheriger enzymatischer Spaltung der letzteren beiden, eine regelrechte Gärung, wobei neben Alkohol und Kohlensäure auch Bernsteinsäure und
35 Glycerin entstehen. Bedingung ist beschränkter Sauerstoffzutritt, völliger Abschluß wird von keinem dieser Pilze vertragen und sistiert sie; Kugelhefenbildung wie bei manchen Mucorineen findet dabei nicht statt, das untergetauchte Mycel behält das gleiche Aussehen. Im Mittel erhielt Laborde bei dieser interessanten Fadenpilzgärung aus 100 g
40 Invertzucker an Alkohol 46,4 g, Kohlensäure 44,4 g, Bernsteinsäure 2,3 g und Glycerin 1,8 g, bei 4—5 g erzeugter Pilzsubstanz (Summa 94,9 g), somit an den zwei erstgenannten je ca. 2 g weniger als bei der Saccharomycetengärung, wo Pasteur 48,6 g Alkohol, 46,8 g Kohlensäure, 3,2 g Glycerin, 0,6 g Bernsteinsäure, bei 1,2 g erzeugter Hefe (Summa
45 100,4 g) fand. Das Bild des gärenden Pilzes ähnelt sehr demjenigen gärender Mucorineen, indem das nach Aussaat sich entwickelnde untergetauchte Mycel alsbald von großen Gasblasen durchsetzt ist und gleichfalls Neigung zum Uebergang in eine Deckenvegetation zeigt. Binnen ca. 6 Wochen entstanden so bis über 8 Proz. Alkohol. Eine 14-proz.
50 Zuckerlösung (Invertzucker) vergor in 16 Tagen bis auf 2 Proz. Zucker und zwar unter merklich schnellerem Verschwinden der Lävulose. Invertierter Milchzucker lieferte eine trägere Gärung (mit 4—5 Proz. Alkohol). Galactose allein vergor merklich schwieriger; schon bei

2—3 Proz. Alkohol stand der Prozeß still. Aehnlich verhielten sich Maltose (1—2 Proz. Alkohol) und Milchzucker (2—3 Proz. Alkohol), deren vorhergehende Spaltung übrigens nicht leicht nachzuweisen sein soll. Der Pilz verzehrt bei Luftzutritt Alkohol mit Leichtigkeit und selbst, wie zuvor schon bemerkt, noch bei 10-proz. Zusatz zur Kulturflüssigkeit; 5 fast der gesamte Zucker einer 10-proz. Lösung verschwindet bei 25° binnen 12 Tagen in Berührung mit der Pilzdecke, ohne daß mehr als 0,2 Proz. Alkohol nachweisbar sind. Im Hinblick auf die erwähnte Tatsache, daß *Asp. niger* und *Penic. glaucum* nach Konidienaussaat auf 3-proz. Alkohol (als einziger Kohlenstoffnahrung) mit anorganischen Nährsalzen 10 zufolge Wehmer zu vollen Decken heranwachsen und solche von *Asp. niger* zufolge Duclaux auch noch 6—8-proz. Alkohol zersetzen, erscheint das ja auch nicht auffällig.

Die Gärwirkung der *Allescheria* — welche französische Forscher übrigens noch fortgesetzt als *Eurotiopsis* bezeichnen — wird nach 15 Mazé (1) durch ein von der Hefenzymase (s. d. 17. Kap.) verschiedenes Enzym hervorgerufen. Die durch Alkohol-Aetherbehandlung mit nachfolgendem Zerreiben der Hyphen erhaltenen Präparate erwiesen sich freilich bisweilen auch ganz wirkungslos.

§ 55. Abbau von Proteinen und deren Derivaten. 20

Das Verflüssigungsvermögen für Gelatine ist bei Hyphenpilzen und so auch bei unseren Aspergillaceen so verbreitet, daß eigentlich nur die Ausnahmen von Interesse sind. Die Schnelligkeit seines Verlaufes — bisweilen vielleicht auch sein Eintreten überhaupt — ist sehr von den besonderen Umständen (Konzentration und Reaktion der Gelatine, 25 An- oder Abwesenheit besonderer Stoffe, Temperatur u. a.) abhängig; selbst die gleiche Spezies verhält sich da nicht immer gleich, so daß die Beurteilung seines diagnostischen Wertes hier wohl eine ähnliche wie bei den Bakterien (vergl. Bd. III, S. 124) ist. Immerhin besitzt das Merkmal seinen Wert. Das Verflüssigungsvermögen von *Penic. glaucum* wurde 30 wohl zuerst von Ad. Hansen (1) im Jahre 1889 näher verfolgt, das von *Asp. niger* auch von Bourquelot (2) im Jahre 1894. Eine zu Orientierungszwecken unternommene vergleichende Prüfung mit Strichkulturen durch Wehmer (1) ergab, daß nur *Asp. glaucus*, *A. fumigatus* und *A. varians* sehr träge und erst nach Wochen meßbar 10-proz. Würze- 35 gelatine bei 15° verflüssigten, indes *A. niger*, *A. Oryzae*, *A. candidus*, *A. minimus*, *A. novus*, *A. Ostianus*, sowie *Penic. glaucum*, *P. luteum*, *P. italicum* und *P. olivaceum* binnen ca. 10 Tagen bereits ungefähr die Hälfte der Gelatine abschmolzen; *Asp. clavatus*, *A. flavus*, *A. Wentii* und *A. giganteus* verflüssigten nach Wehmer (2) ebenfalls prompt. Ver- 40 suche in gleicher Richtung mit ungefähr denselben Pilzen liegen auch von Schäffer (1) vor. Bei Einhaltung ganz bestimmter Bedingungen wird man das gegebenenfalls diagnostisch verwerten können; immerhin wird die Bildung des verflüssigenden Enzyms auch bei Anwesenheit von Zucker gewöhnlich nicht unterdrückt. Ueber die Art des bezw. der 45 proteolytischen Enzyme liegen noch wenig nähere Ermittelungen vor. Das gelatinelösende Enzym von *Penic. glaucum* wurde im Jahre 1889 von Ad. Hansen (1) aus den Pilzdecken mit Glycerin extrahiert; die Lösung führte neutrale Gelatine schneller als saure in Leimpepton über, gleichgültig ob Zucker zugesetzt war oder nicht. Durch Alkohol- 50

fällung war es allerdings nicht zu isolieren, der gewonnene Niederschlag war unwirksam. Er enthielt vielleicht zu geringe Spuren, da die Substanz, wie aus den Versuchen hervorging, tatsächlich aus den Hyphen heraus in das Substrat tritt und auch auf weitere Entfernungen noch
5 durch ein künstlich erzeugtes Collodium-Häutchen hindurch wirkte.

Für eine Reihe von *Penicillium*-Arten sind vergleichende Versuche über Gelatineverflüssigung unter gleichzeitiger Berücksichtigung des Einflusses der Reaktion auf den Verlauf von STOLL (1) angestellt worden. Es wurde dabei und zwar bei derselben Temperatur mit gewöhnlicher,
10 saurer (Ansäuerung durch Normalschwefelsäure) und alkalischer (Zusatz von Normalnatron) Gelatine und Zuckergelatine (2 Proz. Dextrose) gearbeitet. *Penic. brevicaule* verflüssigte alkalische Gelatine schneller als saure (4—6 Tage), dagegen nicht Zuckergelatine, die von *Penic. glaucum* unter den gewöhnlichen Versuchsbedingungen noch lang-
15 sam verflüssigt wurde; bei dieser schien vermehrter Alkali- oder Säurezusatz begünstigend, Steigerung der Zuckerbeigabe dagegen gleichfalls verzögernd zu wirken. *Penic. olivaceum* verflüssigte die gleiche saure wie alkalische Gelatine erst nach fast vier Wochen, indes Zuckergelatine noch nach zwei Wochen unverändert war. Auch *Penic. italicum* wirkte
20 nicht auf die Zuckergelatine, auf saure oder alkalische dagegen nach ca. zwei Wochen, und gleiches Verhalten zeigten *Penic. rubrum* wie *Penic. purpurogenum*, so daß mit der einen Ausnahme von „*Penic. glaucum*" der Zuckerzusatz die Gelatineverflüssigung verhinderte (vergl. Bd. III, S. 125). Diese zunächst nur für die eingehaltenen Versuchs-
25 bedingungen gültige Folgerung ist zwar, wie die vorher mitgeteilten Versuche und auch die Feststellung MALFITANO's erweisen, nicht ohne weiteres zu verallgemeinern, es kommen da voraussichtlich noch mancherlei Umstände (Konzentration der Gelatine, sonstige Nährstoffe u. a.) mit in Frage, denn z. B. wirkt *Penic. brevicaule* auf 10-proz. Würzegelatine (also
30 Gelatine mit Zuckerbeigabe) alsbald deutlich verflüssigend. Näheres über das kulturelle Verhalten von vier *Aspergillus*-Spezies gegen Gelatine findet man in einer neueren Arbeit von TIRABOSCHI (1).

Daß ein Auszug von *Asp. niger* Fibrin und koaguliertes Eieralbumin bei 40° nach kurzem auflöst, auch Gelatine verflüssigt, gab schon
35 BOURQUELOT an. Eingehend beschäftigte sich erst MALFITANO (1) mit diesem Punkte. Zunächst stellte er fest, daß auf die Erzeugung des eiweißlösenden Enzyms („Protease") hier die Art der Ernährung belanglos ist; anscheinend diosmiert dasselbe erst nach dem Tode aus der Zelle. Man gewinnt es aus hierzu getrockneten, jungen, noch
40 lebenden Decken nach vorherigem Zerreiben durch Chloroformwasser und Alkoholfällung. Saure Reaktion verzögerte seine Wirkung, neutrale ist am günstigsten, alkalische ist sehr nachteilig. Außer Gelatine greift es Casein sowie nicht koaguliertes Albumin, doch schwächer, an, koaguliertes dagegen überhaupt nicht, ebensowenig Eieralbumin. Das durch
45 das mitvorhandene Labenzym gefällte Milchcasein wird allmählich gelöst. Wenngleich über die Endprodukte der Einwirkung Näheres noch nicht bekannt ist, so scheint diese Protease doch von Pepsin, Pankreatin wie Papayin verschieden zu sein. Mit der enzymatischen Proteinspaltung durch denselben Pilz beschäftigte sich auch BUTKEWITSCH (1); vergl.
50 darüber Bd. I, S. 311. Nach DUCLAUX (4) enthält „*Penicillium glaucum*" neben dem schon erwähnten Labenzym auch tryptisch wirkende Casease; vergl. Bd. II, S. 152. Der Weiterabbau des Eiweißes durch unsere Pilze ergibt schließlich Amidosäuren und Ammoniak. *Asp. niger* erzeugt

jedoch, wie WEHMER (5) schon im Jahre 1892 zeigte, in Peptonlösung große Mengen von Ammoniumoxalat. 5 g Pepton lieferten mehr als 2 g Calciumoxalat, aus Erbseneiweiß nach KOSJATSCHENKO (1) außerdem Tyrosin, Leucin, Histidin, Arginin und Lysin. „*Penicillium glaucum*“ indessen scheint nach BUTKEWITSCH (1) im wesentlichen zu Amidosäuren 5 (Leucin, Tyrosin) zu spalten: es werden da also wohl tryptische Enzyme, die auch SAITO (2) bei 19 verschiedenen Pilzarten durch Tryptophanbildung nachwies, in Frage kommen. Eine praktisch wichtige Rolle spielt die Frage auch des Eiweißabbaues übrigens bei der durch *Penicillium*-Arten bewirkten Reifung gewisser Käsearten (Brie-, Camembert-, 10 Roquefort-Käse), bezüglich deren kurz auf die Arbeiten von ROGER, EPSTEIN, JENSEN, THOM verwiesen sei; vergl. auch Bd. II, S. 184 u. f.

Milchgerinnung binnen 2—10 Tagen bewirkten übrigens sämtliche von SCHÄFFER (1) darauf geprüften Arten: *Asp. niger*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. Wentii*, *A. Oryzae* (schon nach zwei Tagen), *Penic. glaucum* 15 (nach drei Tagen), *P. luteum*, *P. italicum*, *P. rubrum*, ebenso peptonisierten dieselben Milchcasein, geronnenes Hühnereiweiß, Fibrin (dies mit Ausnahme von *Penic. glaucum* und *Penic. rubrum*) und Pflanzencasein. Auch TEICHERT (1) weist darauf hin, daß „*Penicillium glaucum*“ ausgesprochen caseinabbauend wirkt (s. Bd. II, S. 153). Ebenso wirken 20 die beiden technischen Penicillien des Roquefort- und Camembert-Käses (*P. Roquefort* und *P. Camemberti*) nach CONN, THOM, BOSWORTH, STOCKING und ISSAJEFF (1) durch ein ausgeschiedenes eiweißabbauendes Enzym auf die Käsemasse. Labenzym in *Asp. Oryzae* ist auch von SAITO (2) gefunden worden. *Asp. niger* wie *Penic. glaucum* enthalten nach IWANOFF 25 noch ein die Nucleoproteide in Xanthinbasen und Phosphorsäure spaltendes Enzym, eine Nuclease.

Ein der Urase ähnliches Ammoniak abspaltendes Enzym oder eine Gruppe solcher (Amidasen) kommt nach SHIBATA (1) in *Asp. niger* vor. Das tote, zerriebene Mycel bildete aus Harnstoff, Biuret und 30 gewissen Säureamiden (Acetamid, Oxamid) freies Ammoniak. Nicht angegriffen wurden Urethan, Guanidin, Allantoin, Harnsäure, kaum merklich Benzamid und Asparagin; Hippursäure wurde in Glycocoll und Benzoesäure gespalten. Ammoniakabspaltung sogar auf gewöhnlicher Gelatine sah übrigens STOLL (1) bei *Penic. brevicaule*. Eine unkennt- 35 liche Spezies *Asp. terricola* wird von WILEY (1) als starker Ammoniakbildner im Boden angegeben. Abspaltung von Ammoniakverbindungen aus organischen Stickstoffverbindungen ist immerhin keine spezifische Eigentümlichkeit.

§ 56. Farbstoffe, Gifte, Oxydationen u. a. 40

Auf zuckerhaltigem Substrat mit spurenhaften Beimengungen von Arsen oder arseniger Säure und ihren Salzen entwickeln *Aspergillus glaucus*, „*Penicillium glaucum*“, *Penic. brevicaule* u. a. intensiv riechendes Diäthylarsin; s. darüber Bd. I, S. 294. „*Penic. glaucum*“ und *Asp. flavus* entwickelten nach R. SCHMIDT (1) aus Sulfaten u. a. Schwefelwasserstoff, aus arsen- 45 haltigen Lösungen auch Arsenwasserstoff. *Penicillium*-Mycelien schlagen nach DUBOIS (1) aus kupferhaltigen Flüssigkeiten basisches Kupferkarbonat (Patina) auf Bronze nieder. Der wiederholt behaupteten Fixierung freien Stickstoffes durch „*Penic. glaucum*“ und *Asp. niger* nach BERTHELOT (1), PURIEWITSCH (3), SAIDA (1) wollen wir nur kurz gedenken (s. Bd. III, S. 11). 50

Ueber die Natur der von verschiedenen Arten (*Asp. niger*, *A. glaucus*, *A. Ostianus*, *Penic. luteum* u. a.) erzeugten gelben, braunen und roten Farbstoffe ist noch wenig bekannt. Derjenige von *Asp. niger* („Aspergillin") soll nach LINOSSIER (1) eine organische Eisenverbindung sein, was
5 noch zu beweisen wäre. Der des *Penic. luteum* soll nach ZUKAL (1) eine „Pilzsäure" sein; jedenfalls ist dieser ein alkohollöslicher, durch Wasser wieder fällbarer Körper. Ein goldgelbes Pigment wird nach MILBURN (1) unter bestimmten Bedingungen auch von *Asp. niger* und zwar als Körnchenausscheidung der Lufthyphen erzeugt; die alkoholische Lösung wird durch
10 Alkali, nicht durch Säure, entfärbt, auch Licht zersetzt es, und zwar in einen rötlichbraunen Körper, so daß man es nur in Dunkelkulturen findet. Aus ihm geht vielleicht der dunkle Konidienfarbstoff durch Oxydation hervor. Mit dem rotbraunen Farbstoff des mit *Asp. glaucus* wohl synonymen *Asp. medius* wurden von R. MEISSNER (1) Reaktionen an-
15 gestellt. Die den meisten Aspergillaceen-Schimmeldecken eigenen grünen Konidienfarbstoffe sind überhaupt noch nicht der Beachtung gewürdigt worden. Jedenfalls wären aber die vorgenannten Pigmente aus größeren Kulturen unschwer in wägbaren, der Analyse zugänglichen Mengen zu gewinnen. Das alkohollösliche Pigment von *Asp. versicolor* VUILL. schwankt
20 je nach Reaktion der Nährlösung zwischen gelbbraun, orange und rot, man sehe darüber bei VUILLEMIN (1) sowie COUPIN und FRIEDEL (1). Auf die Abhängigkeit der Bildung gelber bis roter Farbstoffe von der Substratzusammensetzung speziell durch Penicillien (*P. olivaceum*, *P. purpurogenum*, *P. rubrum*) weist STOLL (1) hin.

25 Daß die bei tier- und pflanzenpathogenen Arten (*Asp. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *Penicillium luteum*, *P. glaucum*, *P. italicum*, *P. olivaceum*) zutage tretenden Schädigungen auf Erzeugung bestimmter Giftstoffe beruhen, ist zwar wahrscheinlich, für die ersteren — die auch von GUÉGUEN (1) zusammengestellt sind — ist darüber aber noch
30 nichts Näheres bekannt; auch über den in den Fruchtfäulepilzen wirksamen Stoff konnte J. BEHRENS (1) Genaueres nicht ermitteln, er soll aber kein Enzym und nicht flüchtig sein. Für *Asp. niger*, der nach J. BEHRENS (2) Keimpflanzen gefährlich wird, könnte man der freien Oxalsäure eine solche Rolle zuschreiben. Uebrigens fand LODE (1) in Kulturen tier-
35 pathogener Arten keine giftigen Substanzen.

Genauer verfolgt ist in mehreren Fällen die zerstörende Wirkung auf leichter oxydable Substanzen (organische Säuren und Alkohole), wie sie zumal von erwachsenen Decken ausgeübt wird; es schließt das an die bereits erwähnte Tatsache an, daß Oxalsäure,
40 Citronensäure, Aethylalkohol von den sie bildenden Pilzen (*Asp. niger*, *Penicillium*, *Citromyces*, *Allescheria*) wieder zersetzt werden; das Mitspielen von Oxydasen bleibe dahingestellt. Soweit die betreffenden Substanzen noch geeignete Nährstoffe sind, ist das nicht weiter auffällig (Weinsäure, Citronensäure, Milchsäure u. a.), in wenn auch bescheidenem
45 Maße gilt das bei sehr geringer Konzentration aber wohl für die meisten (Essigsäure, Buttersäure, Propionsäure u. a.). Decken von *Allescheria* (= *Eurotiopsis*) zersetzen nach LABORDE (1) langsam Oxalsäure, Aepfelsäure (noch bei 2 Proz.), Essigsäure (2 Proz.), Propionsäure, Buttersäure (0,8 Proz.), Valeriansäure (0,5 Proz.), Ameisensäure (bis 1 Proz.), rasch
50 wurde inaktive Milchsäure noch bei 5 Proz. und ohne Spaltung in die aktiven Komponenten (vergl. Bd. I, S. 436) zerstört, in kleiner Menge auch Methyl-, Propyl-, Butyl- und Amylalkohol. Solche von *Asp. niger* sollen nach DUCLAUX (2) sogar 8—10-proz. (?) Essigsäure zersetzen, ebenso

Milchsäure, Buttersäure (0,1—0,2 Proz.), von der erst 0,5 Proz. tödlich wirkten; die Essigsäure wurde bei gleichzeitigem Vorhandensein von Buttersäure oder Weinsäure rascher verbrannt als diese. Ob *Asp. niger* in bakterienfreier Kultur wirklich buttersauren Kalk in Karbonat und milchsauren Kalk in Karbonat und Oxalat überführt, wie das DUCLAUX angibt, bedürfte wohl näherer Prüfung, die bloße Behauptung reicht da kaum aus. Ameisensäure wurde von *Asp. niger* und *Penic. glaucum* bei bis 0,08—0,09 Proz. noch zersetzt, größere Dosen (0,12 Proz.) wirkten aber zufolge DUCLAUX schon schädlich, indes Citronensäure, Weinsäure, Aepfelsäure von beiden zufolge WEHMER noch bei gegen 10 Proz. verarbeitet werden. Uebrigens sei hier auch auf die Angaben PFEFFER's (2) über Elektion der Nährstoffe (s. Bd. I, S. 359) verwiesen. Bezüglich der Oxalsäure, über deren Zersetzung schon vereinzelte ältere Angaben von WARBURG (1) durch „*Penic. glaucum*", von DUCLAUX (1), WERNER u. a. vorlagen, ergab sich bei genauerer Prüfung durch WEHMER (3, 4, 5), daß 1-proz. Lösungen von beiden Pilzen nicht mehr angegriffen werden, 0,2—0,5-proz. jedoch allmählich noch völlig zersetzt werden; auch lösliche Oxalate wurden, wenn auch schwieriger und durch *Aspergillus* nur unter besonderen Umständen, angegriffen, zumal aber durch *Penic. glaucum* leicht zerstört, so daß hier 1,5 g Kaliumoxalat binnen 60 Tagen selbst unter Wirkung einer kleinen Decke spurlos verschwand. Bei allen derartigen Versuchen ist aber auf die Art der Nährstoffe sowie die Temperatur Rücksicht zu nehmen. Im Anschluß daran sei bemerkt, daß Absonderung einer Oxydase nach ASO (1) bei *Asp. Oryzae* stattfindet, dieser Pilz nach POZZI-ESCOT (1) auch ein als „Jacquemase" bezeichnetes reduzierendes Enzym erzeugen soll. Die Deckenauszüge sämtlicher von SCHÄFFER (1) untersuchten Arten (s. S. 251) lieferten übrigens mit angesäuerter Guajakol-Lösung nicht den orangefarbenen Niederschlag, der nach BOURQUELOT (9) oxydierende Enzyme anzeigen soll, indes sieben Spezies mit Guajakol und Wasserstoffsuperoxyd positiv reagierten, unter diesen auch „*Penic. glaucum*", das nach GRÜSS (1) keine oxydatischen Wirkungen zeigt. Für *Asp. Oryzae* gibt SAITO (2) Katalase an. *Asp. niger* scheidet nach ALTENBURG (1) eine von RACIBORSKI (1) näher verfolgte, aus Jodkalium Jod freimachende Oxydase aus; die Bildung dieser von RACIBORSKI als Jodidoxydase bezeichneten, noch nicht genauer bekannten Substanz, welche aber weder eine Laccase (s. Bd. I, S. 258) noch ein Chinon oder etwa salpetrige Säure u. dergl. sein kann, findet nur in ganz jungen Kulturen und ausschließlich bei Darbietung von Dextrose oder Rohrzucker statt. In älterem Stadium reduziert der Pilz das ausgeschiedene Jod wieder.

Uebersicht

der von den wichtigeren Arten der Gattungen Aspergillus, Penicillium, Citromyces und Allescheria gebildeten Enzyme und besonderen anderen Stoffe:

Aspergillus niger: Amylase (bei allen Aspergillus-Arten), Invertase, Maltase, Trehalase, Melecitase, Raffinase, Emulsin, Inulase, Tannase, Lipase, Amidase, Protease (bei allen Aspergillus-Arten), Pektinase, keine Lactase(?), keine Cytase(?), Labenzym(?), Jodidoxydase; amorpher braunschwarzer Farbstoff (Aspergillin). Bildet freie Oxalsäure.

Asp. Oryzae: Amylase, Invertase, Maltase, Raffinase(?), Emulsin, Inulase(?); Cytase, Protease, Labenzym, Oxydase, reduzierendes Enzym (Jacquemase), Katalase. Bildet Alkohol(?).

Asp. fumigatus: Labenzym(?), Inulase, Protease, Invertase, Maltase, Amylase, Emulsin.

Asp. glaucus: Emulsin, Maltase, Amylase, Inulase, Labenzym(?), Protease, Invertase; gelbes bis braunrotes festes Pigment. Bildet etwas Alkohol(?).

Asp. Wentii: Emulsin, Cytase (?), Protease, Amylase, Labenzym, Inulase, Invertase, Maltase.
Asp. Ostianus: Amylase, Protease, ockerfarbenes Pigment.
„*Penicillium glaucum*“ (Kollektivspecies): Amylase, Invertase, Maltase, Trehalase, Labenzym, Raffinase, keine Lactase (?), Emulsin, Inulase, Casease, Pektinase, Lipase, Protease (bei allen Penicillium-Arten), keine Cytase. Bildet Alkohol (?) und ein nicht flüchtiges Gift.
Penic. luteum: Emulsin, Pektinase, Maltase, Protease, Labenzym (?), Inulase, Amylase, Invertase, keine Cytase. Bildet körnig-gelbes Pigment, hitzebeständiges Gift und freie Citronensäure.
Penic. italicum: Labenzym (?), Protease, Inulase, Invertase, Maltase, Amylase, Emulsin.
Penic. rubrum: Labenzym (?), Protease, Maltase, Inulase, Invertase, Amylase, Emulsin. Bildet rotes Pigment (ähnlich *P. purpurogenum*).
Penic. brevicaule: Diastase, Protease. Bildet etwas Alkohol.
Citromyces Pfefferianus (desgl. *C. glaber*): Protease. Bildet freie Citronensäure.
Allescheria Gayoni (*Eurotiopsis Gayoni*): Amylase, Lactase, Trehalase, Maltase, Emulsin, Lipase (?), keine Inulase, keine Invertase. Erregt Alkoholgärung.

§ 57. Anwendung von Aspergillus-Arten bei der Bereitung von Nahrungsmitteln in Ostasien.

Die enzymatischen Wirkungen von *Aspergillus*-Arten spielen nicht nur bei der Saké-Bereitung (s. Bd. V, S. 245) technisch eine Rolle. So bedient man sich des *Asp. Oryzae* und des *Asp. Wentii* bei der in Ostasien gebräuchlichen Herstellung verschiedener Bohnenpräparate aus der sonst schwerverdaulichen Sojabohne (*Soja hispida*) zu Nahrungs- und Genußzwecken: Sojasauce (Shoju) und Bohnenbrei (Miso). Die nährstoffreiche Sojabohne, in zahlreichen Varietäten eine wichtige Kulturpflanze Japans, ist selbst gekocht noch schwer verdaulich, ihre ernährungsphysiologische Ausnutzung verlangt also vorbereitende Operationen. Der Anbau im Lande — nach Rathgen (1) um 1890 ca. 3 Millionen Koku (4,8 Mill. hl) jährlich — deckt den noch durch Einfuhr zu ergänzenden Konsum nicht. Ueber Anbauversuche der Pflanze auch in Deutschland berichtete Haberlandt (1). Die Leistung der Pilze besteht nun in einer Lockerung des Kotyledonar-Gefüges der festen, fast stärkefreien aber fett- und eiweißreichen Bohne; es wird der Inhalt chemisch verändert (Eiweißabbau), nachdem die Zellwände gutenteils resorbiert sind.

Japanische Soya (Shoju, Bohnensauce), eine unter Mitwirkung des *Asp. Oryzae* dargestellte, ziemlich dünnflüssige tiefbraune, 15—17 Proz. Kochsalz enthaltende, aromatische Sauce und fast unentbehrliche Würze für Speisen aller Art, wird in Japan fabrikmäßig in einer großen Zahl von Betrieben hergestellt. Mit ihr beschäftigen sich zahlreiche Angaben der Literatur, von Hoffmann (1) im Jahre 1874, Schlegel, Kellner (1), Rathgen (1), Rein (1), Tahara und Kitao (1), Nagai, Nishimura (1) und Wagener (1) bis zu Ansai (1) im Jahre 1904.

Zur Darstellung verwendet man eine als Daidzu benannte, in großem Maßstabe kultivierte, kleinkörnige, hellgelbe Varietät der Sojabohne (Haricot-Soja). Zunächst werden die Bohnen in großen eisernen Kesseln oder Fässern halbweich gekocht und nach dem Erkalten mit Weizen-Koji, das ist gedämpfter Weizen mit Koji vermischt, und geröstetem Weizenmehl gemengt. Koji ist der besonders präparierte, von *Asp. Oryzae* durchsetzte Reis, der auf Grund seines Diastasegehaltes auch als Hilfsstoff bei der Saké-Fabrikation (s. oben) eine Rolle spielt. Die Masse wird dann in kleinen Kästen bei 20—25° drei Tage sich selbst überlassen, wobei der sich lebhaft entwickelnde Pilz sie dicht durch-

wächst, zwischen und in die Zellen eindringt und die durch ihn angreifbaren Stoffe (Wandsubstanz, Eiweiß) löslich macht oder doch für die Auflösung vorbereitet (Enzymbildung). Das ist die erste Phase der Fabrikation; als zweite folgt nunmehr Herstellung des Moromi, das ist das Maischen der kompakten, mit Schimmel durchsetzten Masse unter Salzzusatz, und dann als dritte die eigentliche Gärung. Dazu wird jene in großen, offenen, bis 30 000 l fassenden Bottichen mit Salzwasser zu einem dicken Brei verrührt und täglich mittelst Rührscheit durchgearbeitet, wobei die Masse allmählich dünnflüssig wird. Die hier in dem pilzdurchwucherten Brei vor sich gehenden Prozesse sind offenbar kompliziert und auch in den Einzelheiten noch nicht näher verfolgt. In Frage kommt in der Hauptsache der Eiweißabbau; hier wirken Enzyme wie Salzlösung nebeneinander auf die Zellinhaltsstoffe der Bohne, von der sich das noch unveränderte Eiweiß jedenfalls zum Teil zunächst einfach in dem Salzwasser löst, zu einem anderen Teil aber durch Enzymwirkung weiter abgebaut wird. Die Kohlenhydrate des Weizenmehls sowie die Kotyledonarwände der Bohne (aus Paragalactan bezw. Galactan bestehend) werden verzuckert. Diese Reifung oder „Gärung“ der Masse läßt man Monate und selbst Jahre andauern; sie schwankt nach dem Mischungsverhältnis der Stoffe und der beabsichtigten Saucen-Qualität zwischen 8 Monaten und 5 Jahren. Die Masse färbt sich braun, nimmt ein feines Aroma an und enthält schließlich an gelösten Stoffen neben Salz vorzugsweise Eiweißzersetzungsprodukte; die Kohlenhydrate wie auch die Eiweißkörper sind nahezu oder ganz verschwunden. Bei diesem zu fast völliger Zersetzung der vorhandenen organischen Substanz führenden Reifungsprozesse der Soya wirken vermutlich auch andere Organismen noch mit, — so erwähnt schon F. Cohn (2) eine *Chalara*, ohne daß genaueres darüber bislang festgestellt ist. Wir wissen aber, daß — wie es ja auch die Tatsachen zeigen — der relativ hohe Salzgehalt jedenfalls die Enzymwirkung von *Asp. Oryzae* noch nicht ganz unterdrückt, wenigstens wirkte das verzuckernde Enzym nach Kellner, Mori und Nagaoka (1) selbst noch bei 20 Proz. Kochsalz auf Stärke, wenn auch schwach, ein. Auch einer etwaigen Tätigkeit von Hefen, welche der Koji nach Angabe durchweg enthält, steht der Salzgehalt (vergl. S. 89) nicht im Wege, da die Sakéhefe nach Yabe (1) noch bei 10 Proz. Salz gärt (relative Gärkraft 48,9 Proz.) und erst bei 22 Proz. Salz unwirksam wird. Inwieweit etwa noch andere im technischen Koji vorkommende Organismen oder auch Luftorganismen mitwirken, muß bei den heutigen geringen Kenntnissen des ganzen Prozesses dahingestellt bleiben. In der fertigen Sauce finden sich übrigens reichlich Bakterien (ca. 10—20 000 in 1 ccm), und zwar nach Ansai (1) vorwiegend *Bacillus subtilis* neben *B. mesentericus vulgatus*. Die Mitwirkung solcher ist noch keineswegs ausgeschlossen, aber bislang nicht erörtert. Der Salzgehalt sichert offenbar den normalen Verlauf, er verhindert das Eintreten fauliger Zersetzung. Ob das fette Oel der Bohnen (bis über 20 Proz.) im unvergorenen Rückstande bleibt, oder ob seine durch Enzymwirkung entstandenen Spaltungsprodukte gleichfalls zersetzt werden, ist nicht bekannt. Die Sojabohne enthält außerdem noch Cholesterin, Lecithin und Rohrzucker bei über ein Drittel ihres Gewichtes an Proteinen verschiedener Art.

Nach beendeter Reifung wird das Flüssige von den noch verbliebenen festen Teilen durch Auspressen in baumwollenen oder hanfenen Beuteln getrennt; die Preßrückstände zieht man schließlich noch mit

Salzlösung aus (billige Soyaqualität). Die ersten Abläufe geben die beste Qualität. Die Soya gelangt in Japan in hölzernen Fässern von 20 Litern Inhalt in den Handel; gelegentlich nach Deutschland kommende Präparate sind auf kleine verkapselte Porzellanfläschchen von ca. 100 ccm Inhalt 5 gefüllt.

Die Zusammensetzung der Soyasauce schwankt wohl innerhalb weiterer Grenzen, die von der Gärdauer und dem besonderen Rezept abhängen. KELLNER (1) ermittelte in einem derartigen Präparat (mit 28,75—31,92 Proz. Trockensubstanz): 13,63—16,47 Proz. organische 10 Bestandteile, 15,0—15,45 Proz. Asche (wohl gutenteils Kochsalz), 0,05 bis 0,53 Proz. freie Säure (auf Essigsäure berechnet); an Stickstoff fanden sich 0,7—1,45 Proz. Aehnliche Resultate gab eine von REIN (1) mitgeteilte Analyse KINCH's. Der Stickstoff war allein als Ammoniak, Leucin, Tyrosin und Xanthin vorhanden. Träger des Aromas soll 15 im wesentlichen ein von TAHARA und KITAO (1) dargestellter, kristallisierender Körper von noch nicht genau bekannter Zusammensetzung sein. Auch auf die Mitteilungen von NAGAI und NISHIMURA (1) sei hier verwiesen.

Die Aehnlichkeit der Soya mit dem Fleischextrakt hebt schon 20 KELLNER (1) hervor; neben der anregenden Wirkung betont derselbe ihre Bedeutung für Länder mit vorwiegend vegetabilischer Nahrung als Kochsalzträger. Jedenfalls gibt sie durch Salzgehalt und das ihr eigenartige Aroma den mehr geschmacklosen Reisspeisen einen kräftigen, würzigen Geschmack, das bedingt wohl ihre allgemeine Verwendung in 25 Japan als Zutat. Nach der Statistik wurden im Jahre 1888/89 pro Kopf der Bevölkerung etwa 5,5 Liter konsumiert, die erforderliche Menge von 1,3 Millionen Koku wurde in 10634 vorzugsweise kleineren Betrieben hergestellt. Die nach dem Volumen der zur Pressung gelangenden vergorenen Masse bemessene Steuer beträgt ungefähr 1 Yen (4 Mk.) für 30 einen Koku (1,8 hl) fertiger Soya. Die Ausfuhr gibt RATHGEN (1) für das Jahr 1889 auf 1576 Koku im Werte von ca. 16650 Yen an. Dem Japaner ist die Bohnensauce nach HOFFMANN (1) fast ebenso unentbehrlich wie der Reis, und ihr Gebrauch so allgemein wie der von Tee und Tabak, „der reiche Mann wie der Bettler benutzen sie in gleicher Weise, 35 nur in verschiedener Qualität, als die Hauptwürze ihrer Mahlzeiten, und in keinem Haushalt, bei keiner Mahlzeit darf sie fehlen". Ein beträchtlicher Teil der jährlichen, mehrere Millionen Koku betragenden Bohnenernte wird durch ihre Fabrikation absorbiert. Auf der Pariser Weltausstellung von 1900 waren zufolge NEUVILLE (1) nicht weniger als 40 63 Soja-Aussteller vertreten.

Kurz vor Drucklegung des abgeschlossenen Manuskriptes sind unsere lückenhaften Kenntnisse über die Soyareifung durch eine vorläufige Mitteilung SAITO's (1) nach mehreren Seiten hin ergänzt worden. Neben Verzuckerung und Eiweißabbau im wesentlichen durch den *Aspergillus*, 45 läuft in der gärenden Masse die Bildung von Milchsäure und Alkohol einher; letzterer scheint nach SAITO an dem charakteristischen Aroma der Soja sogar wesentlich beteiligt. Als Milchsäurebildner in dem 15—17 Proz. Kochsalz haltenden Moromi (= Maische) kommen zwei Bakterienarten in Frage, die als *Sarcina Hamaguchiae* und *Bacterium* 50 *Soja* bezeichnet werden; reichlich ist außerdem eine, als *Saccharomyces Soja* benannte, sporenbildende Alkoholhefe (s. S. 179) vorhanden. Man darf wohl annehmen, daß diese letztere von dem benutzten Koji stammt, sie bliebe also noch mit der Saké-Hefe zu vergleichen (s. S. 178). An

sonstigen Organismen, die aber keine besondere Rolle spielen, kommen im Koji wie auch im Moromi die gewöhnlichen Schimmelformen vor, so das „*Penicillium glaucum*", *Cladosporium herbarum* (s. § 59) u. a.; als hautbildend treten *Saccharomyces farinosus* P. Lindner, eine *Mycoderma* und andere auf. Nachteilig können als Bewohner des Koji und den *Aspergillus* überwuchernd jedoch je eine noch nicht näher bestimmte Art von *Rhizopus* und *Tieghemella* werden: der Koji wird durch sie dunkel gefärbt und als wertlos beseitigt. Als wesentlich ist also der Nachweis von Organismen hervorzuheben, welche Milchsäure und Alkohol in der gärenden Masse bilden; diese beiden Produkte sind also auch Bestandteile der Sauce selbst. Die Gegenwart von Alkohol entspricht demnach der auf S. 261 ausgesprochenen Annahme, daß der Salzgehalt zur Unterdrückung der Hefentätigkeit nicht ausreichen dürfte.

Der **japanische Bohnenbrei (Miso)** ist ein aus Sojabohnen fabrikmäßig, aber auch im Haushalt hergestellter, bräunlicher, eiweißreicher, salziger, steifer Brei, der als Zufat bei der Bereitung von Speisen oder zur Darstellung von Suppen in Japan stark konsumiert wird. Auch bei seiner Darstellung bedient man sich des Koji; die Wirkung des *Asp. Oryzae* bei dem eingeleiteten Reifungsprozeß ist, wie schon der Gehalt an unzersetztem Eiweiß zeigt, weniger eingreifend als bei der Soya. Statt Reis-Koji verwendet man auch billigeres Gersten-Koji (s. Bd. V, S. 246). Gelegentlich (so im Haushalt) stellt man den Brei direkt aus dem Rückstand der Soyabereitung dar.

Bei der Fabrikation des Miso wird die gedämpfte Sojabohne in grob breiartigem Zustande mit Koji, Salz (Seesalz) und Wasser in einem Verhältnisse, welches nach der besonderen Art des zu erzielenden Produktes wechselt, gemischt; auch die Dauer des Reifungsprozesses richtet sich nach der Sorte und verläuft demnach entweder in wenigen Tagen oder erfordert Monate. Es kommen auf fünf Raumteile Bohnen je nachdem 3,25—6 Teile Koji und 1,5—2 Teile Salz neben einem Teil Wasser. Die Mischung, über deren Einzelheiten Kellner (1) Daten gegeben hat, wird dann in Fässern, deren Deckel mit Steinen beschwert ist, an einem kühlen Ort bis zum Eintritt der Reife aufbewahrt. Die Reifung oder „Gärung" der vom Pilz durchsetzten Masse ist wohl gleichfalls ein ziemlich komplizierter, jedoch weniger eingreifender Prozeß, bei dem Aufschließung (Lösung und chemische Umwandlung) des erweichten Bohnengewebes, auch lösende und sonstige Wirkung des Salzes in Frage kommen. Das eine faulige Zersetzung verhindernde Salz sichert offenbar den richtigen Verlauf, ein hoher Gehalt verzögert die Reife sehr wesentlich. Man geht aber wohl kaum fehl in der Annahme, daß neben dem *Aspergillus* auch andere gegen den Salzgehalt unempfindliche Organismen (so vermutlich Hefen und Milchsäurebakterien) sich in bescheidenem Maße an der Umsetzung innerhalb dieser nährstoffreichen Masse beteiligen, obschon darüber bislang nichts bekannt ist. Der Brei enthält schließlich nicht bloß Alkohol (0,95—1,92 Proz.) sondern auch Spuren flüchtiger und fixer organischer Säuren (bis 0,3 Proz.) und wechselnde Mengen von Dextrose. Jedenfalls werden sich in den tieferen Schichten des dicken Breies die Prozesse unter Sauerstoffabschluß abspielen; ein näherer Einblick ist bei dem gänzlichen Fehlen diesbezüglicher Untersuchungen nicht möglich.

Die Zusammensetzung des Miso ist durch Kellner (1) geprüft worden. Er ermittelte in verschiedenen Sorten einen Proteingehalt von ca. 10—14 Proz. Der Kochsalzgehalt schwankte zwischen 6—13 Proz.,

stickstofffreie Extraktstoffe waren 6—18 Proz., Zucker 4—12 Proz. vorhanden. Ein von Komaba analysiertes Produkt hatte nach Mitteilung Rein's (1) nur 0,6 Proz. Zucker. Ein höherer Zuckergehalt ist wohl auf besonderen Zusatz desselben zurückzuführen: tatsächlich fabriziert man allerlei Spezialsorten durch Beimischung von Kartoffeln, Ingwer, Zucker, gerösteten Sojabohnen, Sesamöl, Reiskleie u. dergl. vor der Gärung. Von den eigentlichen Fabrikmarken unterscheidet Kellner (1) vier Sorten: 1. Weißes Miso (Shiro Miso) aus grobkörnigen Bohnen mit Reiskoji dargestellt. Die Mischung erfolgt bei 70—90°. Konsumreife nach 3—4 Tagen; nur 10 Tage haltbar. — 2. Jeddo Miso, wie voriges durch Mischung bei 35—45° hergestellt. Reifedauer 2—4 Wochen. Haltbar 4—15 Monate. — 3. Inaka Miso (Land- und Bauern-Miso). Mit Gerstenkoji bereitet, Bohnen sehr lange gedämpft und kalt mit Koji gemischt. Reifedauer 11—12 Monate. Haltbarkeit ca. ein Jahr. Sehr salzreich. — 4. Sendai Miso (nach der Stadt Sendai) = Rotes Miso (Aka). Bereitungsart sehr abweichend. Die zu Brei verriebenen Bohnen werden nach Formung zu prismatischen Stücken wochenlang an der Luft getrocknet, dann erst mit Gerstenkoji, Salz und Wasser gemischt. Reifungsdauer ein bis anderthalb Jahr. Ausgezeichnet durch Aroma, süßen Geschmack und rötliche Farbe.

Der auf Grund seines Eiweißgehaltes gegenüber der Soya sehr nahrhafte Bohnenbrei ist in Japan regelmäßiges, alltägliches Nahrungsmittel. Der jährliche Konsum wird auf über 30 Millionen kg geschätzt; er absorbiert einen erheblichen Teil der Sojabohnenernte. Fabrikmäßig wird Miso in allen größeren Ortschaften hergestellt.

Die **chinesische Soja** (Tao-Yu, Bohnenöl) ist nach Herstellung und Zusammensetzung von der japanischen Soya verschieden, doch liegen nur einige Angaben von Prinsen-Geerligs (1) über ihre Herstellung auf Java seitens chinesischer Fabrikanten vor. Danach benutzt man die schwarzen Varietäten der Sojabohne (*S. hispida tumida β atrosperma* und *S. hispida platycarpa β melanosperma*) mit Zusätzen von Palmzucker, Sternanis und sonstigen aromatischen Pflanzen („Sojakräuter") neben Kochsalz (Seesalz). Koji fällt hier weg; den Aufschließungsprozeß bewirkt ein spontan auftretender Schimmelpilz, der auf S. 205 beschriebene *Asp. Wentii*. Die dunkle Farbe stammt nicht von Zusätzen, sondern aus der Bohne selbst. Die gekochten, in der Sonne getrockneten und abgekühlten Bohnen werden auf Tellern von geflochtenem Bambus ausgebreitet und mit Blättern von *Hibiscus tiliaceus* bedeckt. Alsbald tritt auf denselben regelmäßig der *Aspergillus* auf, der sich in Java angeblich nur auf feuchten Bohnen, eigenartigerweise aber nie auf anderweitigen Nahrungsmitteln ansiedeln soll. Die mit dem Schimmelrasen überzogenen und von Mycel durchsetzten Bohnen gelangen dann in eine starke Salzlösung, die durch acht Tage der Sonne ausgesetzt und schließlich mit ihnen gekocht wird. Die Pilzhyphen sind nun unter mehr oder weniger vollständiger Auflösung der Wände in das Gewebe eingedrungen und haben nach Prinsen-Geerligs (1) auch das Legumin — wohl richtiger die gesamten Proteide — teilweise in Pepton, Asparaginsäure, Leucin, Tyrosin umgesetzt. Die Salzlösung extrahiert schließlich alles lösliche einschließlich des unveränderten Eiweißes; man gießt sie ab, kocht die Bohnen wiederholt mit Wasser aus und engt dann die verschiedenen Auszüge unter Zusatz der genannten Ingredienzien (Zucker und Sojakräutern) bis zum Auftreten eines Salzhäutchens ein. Die Soja, eine schwarzbraune, aromatisch duftende Sauce, ist jetzt konsumfähig; sie

ist hiernach gegenüber dem japanischen Fabrikat kein Gärprodukt, sondern ein mit Kräutern gewürzter konzentrierter Salzauszug der schimmeldurchsetzten Bohne. Ein analysiertes Präparat (von 1,254 spec. Gew.) hatte folgende Zusammensetzung: Zucker 15,00 Proz., alkohollösliche Stickstoffsubstanz (Leucin, Tyrosin, Asparaginsäure, etwas Ammoniak) 4,87 Proz., in Alkohol unlösliche Stickstoffsubstanz (Legumin und Peptone) 2,62 Proz., Kochsalz 17,11 Proz., alkohollösliche stickstofffreie Substanzen (Pektin, schwarzer Farbstoff) 0,78 Proz., Wasser 57,12 Proz. Im Handel existieren verschiedene Qualitäten; die geringeren billigen Sorten sind mit Salzwasser verdünnt. In der chinesischen, javanischen wie europäischen Küche auf Java gilt die Sauce als unentbehrliches Gewürz.

Der **javanische Bohnenbrei** (Tao-Tjiung) ist in manchen Punkten dem japanischen ähnlich, wird jedoch nicht unter Verwendung von Koji bereitet, sondern mit Hilfe eines auf den gekochten und entschalten Bohnen spontan auftretenden *Aspergillus*, über dessen Art Näheres nicht bekannt ist. Da er auf Java nach PRINSEN-GEERLIGS (1) überall vorkommt, kann er wohl nicht der *Asp. Wentii* sein. Ob *Asp. Oryzae*, dem der Pilz sehr ähnlich sein soll, in Java auftritt — was man wohl annehmen darf —, wird in der Literatur nicht erwähnt. Zur Darstellung werden zufolge der kurzen Angaben des genannten Forschers die gequollenen Bohnen (weiße Varietät) enthülst, gekocht und nach Abkühlen mit geröstetem Reis- und Klebreismehl gemischt. In bedeckten Körben, die mit Hibiscus-Blättern ausgelegt sind, entwickelt sich binnen zwei Tagen der Pilz auf dem Gemisch; dies wird feucht und von süßem Geschmack, offenbar geht die Reisstärke in Zucker über. Das Ganze wird dann mit Salzwasser übergossen und bildet so einen steifen Brei, in welchem die Bohnenfragmente orangefarbig erscheinen. Anscheinend verläuft auch hier eine nicht besonders erwähnte Gärung, an der vielleicht verschiedene Organismen beteiligt sind, denn der salzige, zähe Brei soll säuerlichen Geruch haben. Teilweise Zellwand- und Eiweiß-Auflösung sollen Wirkung des Pilzes sein. Die Analyse eines derartigen Produktes ergab bei 62,86 Proz. Wasser und 6,71 Proz. Chlornatrium 6,93 wasserlösliches und 5,74 Proz. unlösliches Eiweiß, überdies 1,21 Proz. Fett, 3,78 Proz. Holzfaser und 16 Proz. eines durch Salzsäure invertierbaren Kohlenhydrates, wovon 8,74 Proz. wasserlöslich waren. Wie das japanische ist auch dieses Präparat auf Grund seines Eiweißgehaltes von erheblichem Nährwert.

§ 58. Anhang: Monascus purpureus und der chinesische Ang-Khak (Ang-Quac).

Monascus purpureus WENT, ein außerhalb der Aspergillaceen stehender Ascomycet aus der Familie der *Monascaceae*, Gruppe der *Hemiasci* (s. Bd. I, S. 209) oder nach neueren Darlegungen KUYPER's (1) der *Endascineae*, ist seiner Farbstoffbildung wegen bemerkenswert. Die Art dient in Ostasien zur Darstellung eines aus dem Pilz und seinen Reiskulturen extrahierbaren roten Pigments von gewerblicher Bedeutung. Der als Ang-Khak (Roter Reis) bezeichnete Handelsartikel Chinas und der malayischen Inseln ist nichts anderes als durch den auf ihm gewachsenen Schimmelpilz *Monascus purpureus* rot gefärbter, getrockneter Reis. Dieser Pilz findet sich nach UYEDA (1) auch in dem Beni-koji (Akakoji),

roten pilzhaltigen Reiskörnern, deren man sich in Formosa zur Herstellung eines roten Reisgetränkes (Anchu, s. Bd. V, S. 251) bedient.

Morphologisch ähnelt der von WENT (1) beschriebene *Monascus purpureus* ganz den bereits bekannten Arten dieser Gattung, von denen bislang drei für Mitteleuropa beschrieben sind, physiologisch durch Erzeugung eines karminroten Farbstoffes insbesonders dem *Monascus heterosporus* (HARZ) SCHRÖTER, welcher von HARZ (1) in der Glycerinlösung einer Seifenfabrik gefunden wurde und bei dem gleichfalls Mycel, Sporen und Konidien rot gefärbt sind. Das reichverzweigte, auf dem Substrat sich weit ausbreitende septierte Mycel des *M. purpureus* erzeugt an Seitenzweigen neben zweierlei Konidien auch kleine, 50 μ im Durchmesser haltende Sporenfrüchte (Perithecien, gewöhnlich als Sporangien bezeichnet) mit zahlreichen, ellipsoidischen, glatten, einzelligen Sporen (von 10,5 μ Länge und 5 μ Breite), die durch Zerreißen der Wand frei werden. Zur Reifezeit ist das Perithecium von einer Hyphenhülle umgeben, die unterhalb des noch jungen Organs aus dem Tragfaden hervorwächst.



Fig. 77. Monascus purpureus.
a Junges aus der Konidie (×) hervorgegangenes Mycel mit sich entwickelnden Perithecienanlagen an der Spitze der Seitenzweige. *b* Konidienbildender Abschnitt. *c—e* Entwicklung des Peritheciums. *f—g* Chlamydosporen. — Vergr. von *a*: 240, des übrigen ca. 520. Nach WENT.

Bezüglich der Entwicklungsgeschichte und der sich daraus ableitenden Folgerungen über die systematische Stellung der Art sei hier kurz auf die neueren Untersuchungen von UYEDA (1), IKENO (1), BARKER (1) sowie KUYPER (1) verwiesen. Durch Abschnüren an den Enden anderer Zweige entstehen kleine Ketten von Konidien oder einzeln stehende, etwas größere (Makrokonidien), die WENT als Chlamydosporen bezeichnet; die Größe dieser beiderlei Organe hält sich etwas unterhalb und oberhalb der Sporengröße. Alle Teile sind rot gefärbt oder richtiger, sie können rot gefärbt sein; tatsächlich ist die Färbung sehr ungleich, denn während ein Teil des Pilzes rot ist, kann ein anderer ganz farblos sein. Aus toten Teilen austretender Farbstoff vermag, ohne daß diese

merklich entfärbt werden, der Nährlösung wie auch der Unterlage gleiche Färbung zu geben. Als Sitz des Farbstoffes kommen schließlich alle Teile in Frage; die Verteilung ist aber sehr unregelmäßig, bald sind die Konidien, bald die Hyphen, bald die Wand oder die Sporen des Peritheciums gefärbt. WENT versuchte auch, die Bedingungen der Farb- 5 stoffbildung aufzuklären, erzielte dabei aber kein positives Resultat. Die Ernährungsweise schien keinen merklichen Einfluß zu haben; Sauerstoffmangel (untergetauchte Vegetation) ließ allerdings die Farbe sich nicht entwickeln. Untergetaucht erzogene Mycelien röteten sich späterhin, an der Luft kultiviert, wenn sie noch lebten, jedoch nicht nach 10 vorherigem Abtöten.

Ueber das Verhalten des isolierten Pigments liegen einige Angaben vor. In Wasser fast unlöslich, kann es durch Chloroform, Aethylalkohol und Methylalkohol, Aether, Aceton oder Eisessig leicht in Lösung gebracht werden, dagegen nicht durch Benzol, Petroläther, 15 Terpentin, Glycerin. Die je nach der Konzentration hellrubin bis tief blutrote, in etwas dichteren Schichten fast braunrote, grünlich fluoreszierende Lösung liefert den Farbstoff nach Verdunsten des Lösungsmittels stets nur als amorphen Lack; um ihn aus dem Ang-Khak vollständig zu extrahieren — was übrigens nur schwer gelingt — bedarf 20 es ausdauernder Behandlung mit immer erneuertem Lösungsmittel, wobei trotzdem der Reis schließlich noch gefärbt zurückbleibt. Calcium- und Baryumchlorid fällen die ammoniakalische Lösung. Reduktions- wie auch Oxydationsmittel und Chlor lassen nach WENT die Farbe nur vorübergehend verschwinden. Die Substanz schmilzt bei ungefähr 50° C; sie 25 ist nicht ohne Zersetzung sublimierbar. Bestimmtes über ihre chemische Natur ist außer darüber, daß der Körper aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff besteht und stickstofffrei ist, auch durch die Untersuchung von PRINSEN-GEERLIGS (2) nicht ermittelt worden. Anscheinend ist es ein Anthrachinonderivat, verhält sich Reagentien gegenüber auch 30 wie die meisten Anilinfarben, ist aber durch Quecksilberoxyd fällbar. Wie dem auch sei, für europäische Verhältnisse hat der von BOORSMA (1) als „(α- und β-) Oryzalrubin" benannte Farbstoff angesichts der hochentwickelten Anilinfarbenindustrie keinen technischen Wert; auch in China wird er vielleicht mit der Zeit durch künstliche Farbstoffe, gerade 35 wie Krapp und Indigo, ersetzt werden; schließlich allein entscheidend ist da nur der Kostenpunkt. Sein Färbevermögen hält nach einer früheren (brieflichen) Mitteilung von A. SCHEURER-KESTNER auf Grund eines Versuches, der von den Fabriques de Produits Chimiques zu Thann (Elsaß) mit einem ihnen vom Verfasser übermittelten Präparate angestellt 40 worden ist, keinen Vergleich mit unseren, überdies außerordentlich wohlfeilen, schönen Anilinfarben aus. Uebrigens ist derselbe wie die allmähliche Zersetzung der Lösungen und auch das Ausbleichen des Ang-Khak selbst unter Licht- und Luftwirkung zeigt, keineswegs so ganz unzerstörbar. 45

Auch der karminrote, von HARZ als „Physomycin" (nach dem früher als *Physomyces heterosporus* bezeichneten Pilz) aufgeführte Farbstoff des *Monascus heterosporus* (HARZ) SCHRÖTER ist in Wasser unlöslich, in Alkohol mit grünlichbrauner Fluoreszenz löslich, zeigt darin also weitgehende Uebereinstimmung mit dem des roten Reises. Wenn die 50 beiden Pilze nicht dieselben sind, so ist die Aehnlichkeit jedenfalls eine große, zumal auch die morphologischen Verhältnisse, Dimensionen u. a. kaum differieren.

Die Farbe des Ang-Khak (Ang-Quac), des „roten Reises", des Handels ist ein mattes bis graues Hellrot. Die von den Pilzhyphen dicht durchsetzten Reiskörner ohne sichtbare Hyphenvegetation sind, von der Farbe abgesehen, äußerlich wenig verändert, doch relativ mürbe und leicht im Mörser zu feinem, graurotem Pulver zu zerreiben; in dieser Form kommt er gleichfalls in den Handel. Seine Hauptverwendung in Ostasien findet der Ang-Khak zum Färben von Speisen, insbesondere von Fischgerichten (Macassar-Fische), bei deren Zubereitung diese fuchsinähnliche Farbe beliebt ist, ebenso von Reiswein und Reisbranntwein, Kuchen und Broten (durch Bestreichen). Dargestellt wird er allein in China und von hier nach Java und anderen Inseln des Archipels exportiert. Nur die Chinesen, diese alten geschickten Pilzzüchter, ohne übrigens Pilze zu kennen, besitzen, wie VORDERMAN (1) erzählt, die Kunst seiner Fabrikation und hüten sie als Geheimnis. Anscheinend sind es in China auch nur einige Ortschaften in der Provinz Quouan-Toung, wo man sich mit derselben befaßt. Einzelheiten über die Art des Verfahrens sind kaum bekannt. Man bedient sich dort dunkler, kühler, unterirdischer Räume (Höhlen, Keller), in denen der gedämpfte Reis ausgebreitet wird und nach dem Erkalten mit gepulvertem Ang-Khak der vorigen Bereitung bestreut wird. Nach Verlauf von etwa sechs Tagen hat die ganze, mit einem hellen, wolligen Pilzrasen bedeckte Reismasse rote Farbe angenommen, die weiterhin unter lebhafter Vegetation des *Monascus* intensiver wird. Schließlich unterbricht man den Verlauf und erhält durch Trocknenlassen das fertige, zwischen den Fingern zerreibbare Produkt. Für den Export findet noch Parfümierung mit flüchtigem Oel (Senf- oder Knoblauchöl) statt. Ein noch etwas dunkler Punkt scheint der Gehalt der Handelsware an Arsenik, den WILLIAMS (1) und VORDERMAN nachwiesen, zu sein. Vermutet wird, daß die Chinesen absichtlich arsenige Säure — vielleicht auf Grund von Erfahrungen über den so erzielten besseren Verlauf der Operation (Ausschluß fremder Pilze) — zusetzen, doch ist das eben nur eine Annahme; auch Insekten sollen nach anderen dadurch abgehalten werden. Wie WENT feststellte, entwickelte sich der Pilz bei 0,1 Proz. arseniger Säure noch normal, aber nicht mehr bei 0,5 Proz., während 1 Proz. tötend wirkt. Ob andere Organismen (Bakterien) durch solch geringe Mengen, wie hier in Frage kommen, tatsächlich ausgeschlossen werden, bleibt noch zu zeigen. Vielleicht war der Arsengehalt überhaupt nur durch sonstige rein zufällige Umstände bedingt; es handelt sich tatsächlich um minimale Spuren.

Als *Monascus Barkeri* wurde von DANGEARD (1) eine dem *M. purpureus* ähnliche Art benannt, die von BARKER (1) in einem der auf Malakka zur Bereitung des „Samzu" dienenden Reismehlkuchen gefunden worden war. Ihr Mycel ist jedoch nicht braunrot, sondern schwärzlich. Die Entwicklungsgeschichte des Peritheciums beider Arten ist vergleichend von KUYPER (1) studiert worden.

Literatur

zum Kapitel Chemische Wirkungen der Aspergillaceen.

***Altenburg,** (1) Cit. n. Kobert 1). ***Ansai,** (1) Mitt. d. mediz. Gesellsch. zu Tokio, 1904, Bd. 17, Nr. 6, S. 1. ***Aso,** (1) Cit. n. Kozai 1). ***Banning,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 395. ***Barker,** (1) Annals of Botany, 1903, Bd. 17, S. 187. ***Bary, A. de,** (1) Bot. Ztg., 1886, Bd. 34, S. 377. ***Béchamp,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1864, Bd. 59, S. 496. ***Behrens,** J., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 514. — 2) Jahresber. pro 1903 d. Landw. Versuchsanstalt Augusten-

berg, 1904, S. 43. ***Berthelot,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1893, Bd. 116, S. 842. ***Boorsma,** (1) Geneesk. Tijdschrift v. Nederl. Indië, 1896, Bd. 35, 5. Liefg.; Nederl. Tijdschrift v. Pharm., 1896, Bd. 8, S. 126. ***Bourquelot,** (1) Comptes rendus Soc. de Biologie, 1893, Bd. 45, S. 653 u. 804. — (2) Ebenda, 1893, Bd. 45, S. 425. — (3) Comptes rend. de l'Ac., 1893, Bd. 116, S. 826. — (4) Bull. Soc. mycolog. de France, 1893, Bd. 9, S. 230. — (5) Comptes rendus Soc. de Biologie, 1896, Bd. 48, S. 205. — (6) Comptes rend. de l'Ac., 1902, Bd. 135, S. 349, und Journ. de Pharm. et de Chim., 1903, Bd. 16, S. 578. — (7) Bull. Soc. mycolog. de France, 1894, Bd. 9, S. 230. — (8) Comptes rendus Soc. de Biologie, 1903, Bd. 55, S. 386. — (9) Ebenda, 1896, Bd. 48, S. 896. ***Bourquelot** und **Graziani,** (1) Bull. Soc. mycolog. de France, 1896, Bd. 12, S. 27. ***Bourquelot** und **Hérrissey,** (1) Journ. de Pharm. et de Chim., 1897, Bd. 4, S. 385. — (2) Comptes rend. de l'Ac., 1895, Bd. 121, S. 696. — (3) Ebenda, 1901, Bd. 132, S. 571. ***Bremer,** (1) Dissert., Münster 1902. ***Brunstein,** (1) Beihefte z. Bot. Centralbl., 1901, Bd. 10, S. 1. ***Butkewitsch,** (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1900, Bd. 18, S. 185. ***Calmette,** (1) Revue scientif., 1892, 27. Febr. ***Camus,** (1) Comptes rendus Soc. de Biologie, 1897, Bd. 49, S. 192. — (2) Ebenda, S. 230. ***Charpentier,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1905, Bd. 141, S. 367 u. 429. ***Cohn,** F., (1) Jahresbericht d. schles. Ges. f. vaterl. Kultur, 1890. — (2) Ebenda, 1883, Bd. 61, S. 226. ***Conn, Thom, Bosworth, Stocking** und **Issajeff,** (1) U. St. Department of Agriculture, Bull. Nr. 71, Bureau of Animal Industrie, Washington 1905. ***Coupin,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1904, Bd. 138, S. 389. ***Coupin** und **Friedel,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1904, Bd. 138, S. 1118. ***Czapek,** (1) Biochemie d. Pflanzen, Jena 1905. ***Dangeard,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1903, Bd. 137, S. 1281. ***Dean,** (1) Botan. Gazette, 1903, Bd. 35, Jan. ***Dubois,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1890, Bd. 111, S. 655. ***Duclaux,** (1) Chimie biologique, 1883, S. 142, 193 u. 219. — (2) Ann. Pasteur, 1892, Bd. 6, S. 593. — (3) Ebenda, 1889, Bd. 3, S. 97. — (4) Le lait, Paris 1887. ***Effront,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1892, Bd. 95, S. 1324. ***Elfving,** (1) Studien ü. d. Einwirkung d. Lichtes auf Pilze. Helsinfors 1890. ***Emmerling,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1903, Bd. 10, S. 273. ***Fernbach,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1900, Bd. 131, S. 1214. — (2) Annales de la brasserie et distillerie, 1899, Bd. 2, S. 409. — (3) Recherches sur la sucrase. Thèse. Paris 1890. ***Fischer,** E., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1890, Bd. 23, S. 370. — (2) Ebenda, 1895, Bd. 28, S. 1432. ***Garnier,** (1) Comptes rendus Soc. de Biologie, 1903, 4. u. 18. Dez. ***Gayon,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1878, Bd. 86, S. 52. ***Gérard,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1897, Bd. 124, S. 370. — (2) Comptes rendus Soc. de Biologie, 1893, S. 651. — (3) Journ. de Pharm. et de Chim., 1893, 5. sér., Bd. 28, S. 11. ***Gillot,** (1) Bull. de l'Assoc. belge des chimistes, 1900, S. 202. — (2) Ebenda, 1899, S. 496. ***Gosio,** (1) Archives ital. de Biologie, 1892, Bd. 18, S. 253. — (2) Ref. in Bot. Centralbl., 1901, Bd. 87, S. 131. ***Graf,** (1) Jahresber. d. Brauer-Akademie München pro 1899/1900, S. 28. ***Grüß,** (1) In: Festschrift f. Schwendener 1899. ***Guéguen,** (1) Les champignons parasites de l'Homme et des Animaux. Paris 1904. ***Haberlandt,** (1) Die Sojabohne, Wien 1878. ***Hansen,** Ad., (1) Flora, 1889, Bd. 72, S. 88. ***Harriot** und **Camus,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1897, Bd. 124, S. 235. ***Harz,** (1) Bot. Centralbl., 1890, Bd. 41, S. 378. ***Hebebrand,** (1) Ref. in Chem. Centralbl., 1893, Bd. 1, S. 223. ***Heinze,** (1) Annales Mycologici, 1903, Bd. 1, S. 344, und Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 12, S. 180; 1905, Bd. 14, S. 9. ***Hérissey,** (1) Comptes rendus Soc. de Biologie, 1896, Bd. 48, S. 915. — (2) Ebenda, 1896, Bd. 48, S. 640. — (3) Bull. Soc. mycolog. de France, 1899, Bd. 15. ***Hoffmann,** (1) Mitteil. d. Deutsch. Ges. f. Natur- u. Völkerkunde Ostasiens, 1874, Heft 6, S. 8. ***Ikeno,** (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1903, Bd. 21, S. 259. ***Jost,** (1) Vorlesungen ü. Pflanzenphysiologie. Jena 1904. ***Kellner,** (1) Chem.-Ztg., 1895, Bd. 19, S. 120 u. 265. ***Kellner, Mori** und **Nagaoka,** (1) Z. f. physiolog. Chem., 1889, Bd. 14, S. 293. ***Kobert,** R., (1) Lehrbuch d. Intoxikationen, 1904, Bd. 2, S. 186. ***Korschelt,** (1) Mitteil. d. Deutsch. Ges. f. Natur- u. Völkerkunde Ostasiens, 1876, Heft 16, S. 240. ***Kosjatschenko,** (1) Journ. f. experiment. Landwirtschaft, 1903, Heft 4, S. 439 (russisch). ***Kostytschew,** (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1902, Bd. 20, S. 327. ***Kozai,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1900, Bd. 6, S. 385. ***Kuyper,** (1) Annales Mycologici, 1905, Bd. 3, S. 32. ***Laborde,** (1) Ann. Pasteur, 1897, Bd. 11, S. 1. ***Laroque,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1852, Bd. 35, S. 221. ***Laxa,** (1) Arch. f. Hyg., 1902, Bd. 41, S. 119. ***Lind,** (1) Jahrb. wiss. Bot., 1898, Bd. 32, S. 603. ***Linossier,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1891, Bd. 112, S. 489 u. 807. ***Lode,** (1) Arch. f. Hyg., 1902, Bd. 42, S. 152. ***Malfitano,** (1) Ann. Pasteur, 1900, Bd. 14, S. 60 u. 420. ***Mazé,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1902, Bd. 134, S. 191; Bd. 135, S. 113. ***Mazé** und **Perrier,** (1) Ann. Pasteur, 1904, Bd. 18, S. 553; Comptes rend. de l'Ac., 1904, Bd. 139, S. 311. ***Meissner,** Richard, (1) Bot. Ztg., 2. Abt., 1897, Bd. 55, S. 337. ***Milburn,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 13, S. 268. ***Miyoshi,** (1) Jahrb. wiss. Bot., 1895, Bd. 28, S. 227. ***Molliard** und **Coupin,** (1) Revue génér. de Botanique, 1903, Bd. 15, S. 401. ***Neuville,** (1) Les ferments industriels de l'Extrême-Orient, Paris 1902, S. 175.

*Newcombe, (1) Annals of Botany, 1899, Bd. 13, S. 49; Bot. Centralbl., 1898, Bd. 73, S. 105. *Nishimura, (1) Bull. Coll. Agricult., Tokyo, Bd. 3, S. 191. *Okamura und Takakusu, (1) Cit. n. Kozai (1). *Oppenheimer, (1) Die Fermente. 2. Aufl., 1903, S. 242. *Pasteur, (1) Etudes s. la bière, 1876, S. 100. *Petit, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1899, Bd. 128, S. 1176. *Pfeffer, (1) Sitzgsber. d. Kgl. Sächs. Ges. d. Wiss., Leipzig, Math.-physik. Kl., 1896, S. 513. — (2) Jahrb. wiss. Bot., 1895, Bd. 28, S. 206. — (3) Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., Bd. 1. *Pottevin, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1900, Bd. 131, S. 1215. *Pozzi-Escot, (1) Bull. Soc. Chimique, 1901, Bd. 27, S. 557. *Prinsen-Geerligs, (1) Chem.-Ztg., 1896, Bd. 20, S. 67. — (2) Ebenda, 1895, Bd. 19, S. 1311. *Puriewitsch, (1) Comptes rendus Soc. de Biologie, 1897, S. 686. — (2) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1898, Bd. 16, S. 368. — (3) Ebenda, 1895, Bd. 13, S. 339. *Raciborski, (1) Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie, Cl. des Sciences Math. et Nat., 1905, Okt., S. 693. *Rathgen, (1) Japans Volkswirtschaft u. Staatshaushalt 1891. *Rein, (1) Japan. 1886, Bd. 2, S. 111. *Robiquet, (1) Journ. de Pharm. et de Chim., 1852, Bd. 22, S. 121. *Saida, (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1901, Bd. 19, Generalvers.-Heft, S. [107]. *Saito, (1) Botan. Magazine, Tokyo, 1905, Bd. 19, Nr. 222, S. 75. — (2) Ebenda, 1903, Bd. 18, S. 75. *Sanguineti, (1) Ann. Pasteur, 1897, Bd. 11, S. 264. *Schäffer, (1) Dissert., Erlangen 1901, S. 15. *Schmidt, R. H., (1) Sitzgsber. d. physik.-medic. Societät Erlangen. 1898, Heft 30. *Schröter, (1) Kryptogamenflora Schlesiens, 1893, III. Bd., 2. Hälfte, S. 218. *Shibata, (1) Beiträge z. Chem. Physiologie u. Pathologie, 1904, Bd. 5, S. 384. *Stoll, (1) Dissert., Würzburg 1904. *Tahara und Kitao, (1) Ref. in Chem. Centralbl., 1889, Bd. 1, S. 732. *Teichert, (1) Milchztg., 1903, Bd. 32, S. 785. *van Tieghem, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1867, Bd. 65, S. 1091; Ann. de l'Ecole normale supér., 1869, Bd. 6, S. 27. *Tiraboschi, (1) Annali di Botanica, 1905, Bd. 2, Heft 1, S. 150 u. f. *Uyeda, (1) The botan. Magazine, Tokyo, 1902, Bd. 15, S. 160. *Vorderman, (1) Geneeskundig Tijdschrift voor Nederl. Indië, 1894, Bd. 34, Nr. 5. *Vuillemin, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1904, Bd. 138, S. 1350. *Wagener, (1) Oesterr. Monatsschrift f. d. Orient, 1881, Nr. 12. *Warburg, (1) Untersuchungen a. d. Bot. Inst. z. Tübingen, 1886, Bd. 2, S. 54. *Wehmer, (1) Chem.-Ztg., 1895, Bd. 19, S. 2038. — (2) Die Pilzgattung Aspergillus, Genf, 1901, S. 62 u. f. — (3) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1891, Bd. 9, S. 223. — (4) Ebenda, S. 163. — (5) Bot. Ztg., 1891, Bd. 49, S. 233, und Liebigs Ann., 1892, Bd. 269, S. 383. — (6) D. Pilzgattung Aspergillus, S. 118. — (7) Beiträge z. Kenntnis einheimischer Pilze, Hannover u. Leipzig 1892, Heft 1, und Sitzgsber. der kgl. Akad. d. Wiss. zu Berlin, 1893, S. 519. — (8) Chem.-Ztg., 1897, Bd. 21, S. 1022. — (9) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1897, Bd. 3, S. 102. — (10) Bull. Soc. Chimique, 1893, S. 728, und Comptes rend. de l'Ac., 1893, Bd. 117, S. 332. *Went, (1) Ann. des sciences nat., Botan., 1895, 8. sér. Bd. 1, S. 1. — (2) Verhandl. d. Koninkl. Akad. v. Wetensch. te Amsterdam, 1904, 26. Aug., S. 83. *Wiley, (1) Journ. of Franklin Institute, 1897, Bd. 143, S. 293. *Williams, (1) Chinese Commercial guide, 4. edit., 1856. *Yabe, (1) Bull. College of Agricult., Tokyo, 1896, Bd. 2, S. 219. *Zopf, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1889, Bd. 7, S. 95; s. auch Ber. d. Deutsch. Botan. Ges., 1900, Bd. 18, S. 32. *Zukal, (1) Sitzgsber. d. Kais. Akad. d. Wiss. in Wien, Math.-naturw. Kl., 1889, Bd. 98, 1. Abt., S. 561.

(*Manuskript-Einlauf: 6. Jan. 1906.*)

12. Kapitel.

Mycosphaerella Tulasnei und Sphaerulina intermixta, bezw. Cladosporium herbarum und Dematium pullulans.

Von Prof. Dr. G. Lindau.

§ 59. Cladosporium herbarum.

An Reichtum der Gattungen und Arten die übrigen drei Unterordnungen der Ordnung der *Pyrenomycetes* (vergl. Bd. I, S. 212) weit überragend ist die vierte, nämlich die Unterordnung der *Sphaeriales*. Es 5 sind daraus zwei Arten aus der Familie der *Mycosphaerellaceen*, welche

uns hier etwas näher angehen, während eine dritte nur mit einer vorübergehenden Bemerkung bedacht werden kann. Diese letztere ist der früher *Laestadia Bidwellii* und jetzt *Guignardia Bidwellii* genannte Erreger des Black-rot der Reben, über welchen in den Handbüchern über Phytopathologie, so in denen von VIALA (1) und SORAUER (1), Näheres zu finden ist. Die Ascosporen dieses Pilzes sind einzellig, seltener im reifen Zustande zweizellig.

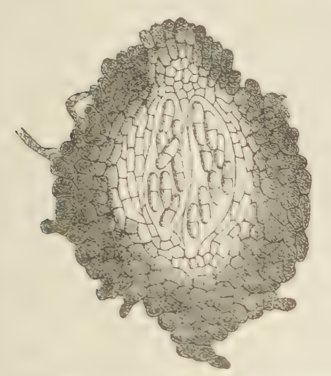


Fig. 78. Mycosphaerella Tulasnei (E. JANCZ.). Längsschnitt durch ein Perithecium. — Vergr. 325. Nach JANCZEWSKI.

Die sehr zahlreichen Arten aus der Gattung *Mycosphaerella* (früher *Sphaerella* genannt) hingegen bringen zweizellige Ascosporen hervor, diejenigen aus der Gattung *Sphaerulina* (s. S. 274) sogar drei- und mehrzellige Ascosporen. Aus der erstgenannten dieser zwei Gattungen kommt für uns nur eine einzige Art in Betracht: das ist *Mycosphaerella Tulasnei*, und zwar deren Konidienfruktifikation, welche man bis vor kurzem noch unter dem von H. F. LINK gegebenen selbständigen Namen *Cladosporium herbarum* beschrieben hatte, bis dann im Jahre 1893 durch ED. JANCZEWSKI (1) der besagte Zusammenhang aufgedeckt wurde. Es gelang ihm, die Entwicklung dieses neuen Ascomyceten aus den Ascosporen bis zur Entstehung reifer Perithecien (s. *Fig. 78*) zu verfolgen und dabei als Nebenfruchtform auch jene genannte Konidienfruktifikation (s. *Fig. 79*) zu erhalten, welche allein uns in dem vorliegenden Paragraphen nun beschäftigen soll.

Das *Cladosporium herbarum* ist in systematischer Beziehung wahrscheinlich eine sogen. Sammelspezies und tritt je nach den Züchtungsbedingungen in etwas verschiedener Gestalt auf. So ist es erklärlich, daß vordem durch G. FRESENIUS (1) und P. A. SACCARDO (1) unter den Namen *Penicillium cladosporioides* bezw. *Hormodendron cladosporioides* angeblich selbständige Arten beschrieben worden sind, deren Zugehörigkeit zu dem Formenkreise von *Mycosphaerella Tulasnei* dann JANCZEWSKI dargetan hat. Sie ist aber neuerdings durch W. SCHOSTAKOWITSCH (1) wieder bestritten worden, da es diesem nicht hatte glücken wollen, das sogen. *Hormodendron cladosporioides* in das *Cladosporium herbarum* überzuführen. Die von TULASNE (1) angenommene Zugehörigkeit des *Cladosporium herbarum* zum Entwicklungskreise von *Pleospora herbarum* war schon durch die Ergebnisse der durch GIBELLI und GRIFFINI (1), durch H. BAUKE (1 u. 2) und durch F. G. KOHL (1) angestellten Beobachtungen und Untersuchungen als nicht bestehend erwiesen worden. Man wird also nach dem gegenwärtigen Stande unserer Kenntnisse behaupten dürfen, daß von den bisher beschriebenen Formen von *Cladosporium herbarum* eine Gruppe durch JANCZEWSKI als zugehörig zu dem Entwicklungskreise der *Mycosphaerella Tulasnei* erkannt ist, daß jedoch andere, bei denen solche Zugehörigkeit bisher nicht erwiesen worden ist, bis auf weiteres noch als selbständige Arten in der Literatur fortgeführt werden müssen. Derartiges gilt z. B. von jener Konidienfruktifikation, welche durch LOPRIORE (1) unter dem Namen *Cladosporium herbarum* beschrieben worden ist. Diese Art nämlich vermag Sklerotien zu er-

zeugen, welche im Ackerboden auf den Spelzen sowohl von gekeimten als auch von ungekeimten Weizenkörnern entstehen.

Der Verlauf der Entwicklung der als *Cladosporium herbarum* bezeichneten Konidienfruktifikation von *Mycosphaerella Tulasnei* nun, wie 5 ihn zuerst E. LOEW (2) unter dem Mikroskope verfolgt hatte, ist das gerade Gegenstück zu jenem bei *Penicillium glaucum*. Hier, bei diesem letzteren, ist das äußerste (dem Wachstumsmittelpunkte fernste) Glied einer Konidienkette 10 das älteste und größte; die Abschnürung der einzelnen Glieder schreitet also vom Umfange nach dem Mittelpunkte (Basis) des Pilzrasens vor, ist also basipetal (vergl. Bd. I, S. 192). Die einzelnen Konidien werden nacheinander un- 15 mittelbar unter der vorhergehenden vom Träger hervorgebracht, welcher dann, um die dadurch erlittene Kürzung wett zu machen und zu einer abermaligen Abschnürung gerüstet zu sein, sich um ein entsprechendes Stück verlängert. Bei 20 dem *Cladosporium herbarum* hingegen ist die unmittelbare Abschnürungstätigkeit des Trägers mit der Hervorbringung der ersten Konidie schon abgeschlossen; alle folgenden werden von dieser selbst, bezw. von den inzwischen entstan- 25 denen Tochterzellen, auf dem Wege der Sprossung hervorgebracht. Es ist also hier die unterste Zelle die älteste, die oberste hingegen die jüngste; die Konidienbildung somit von unten (von der Basis) nach oben (nach der Spitze zu) 30 gerichtet, basifugal oder (was dasselbe sagt) akropetal. Das Sprossungsvermögen einer Konidie beschränkt sich nun dabei nicht auf die Hervorbringung einer einzigen Tochterkonidie, sondern jene treibt oft noch, knapp 35 neben dieser, eine zweite Knospe hervor, die sich ihrerseits ebenso verhalten kann, so daß dadurch ein reich verästeltes Gebilde zustande kommt, wie es in der *Fig. 80* in seiner allmählichen Entwicklung dargestellt ist. Der in basipetaler 40 Richtung vor sich gehenden Konidienabschnürung bei *Penicillium glaucum* hingegen ist eine derartige Entfaltung selbstverständlich versagt; hier bleibt es eben bei der einfachen Konidienkette.



Fig. 79. Mycosphaerella Tulasnei (E. JANCZ.). Mycelfaden mit Konidien. Nach JANCZEWSKI. Vergr. 250.

45 Den Beobachtungen von JANCZEWSKI (2) zufolge obwaltet in Hinsicht auf die Abmessungen des Mycels und der Konidien bei *Cladosporium herbarum* eine recht auffällige Mannigfaltigkeit, welche es auch erklärlich macht, daß man früher, in Unkenntnis dieser Tatsache, jene verschiedenen Gestaltungen für verschiedene Arten gehalten hat. So 50 schwankt die Länge der gewöhnlich eiähnlichen Konidien (s. *Fig. 81*) von 12—25 μ, die Breite von 5—10 μ. Dementsprechend wechseln auch die Abmessungen der Mycelfäden, so daß jener Forscher geradezu von einer Riesengestalt einerseits und von einer Zwerggestalt andererseits sprechen

konnte. Auch die Zahl der Scheidewände innerhalb der Konidien wechselt je nach dem Alter; bald sind deren zwei vorhanden, in einer anderen Zelle wieder findet sich nur eine, und in einer dritten fehlen sie ganz. Die Außenfläche der (braunen oder olivengrünen) Membran der Konidien kann mit feinen Nadeln (Kristallen?) besetzt sein. Manchmal ist sie jedoch glatt. Der Systematiker hat nach diesem Merkmal verschiedene Arten von *Cladosporium* aufgestellt, doch läßt sich nach unseren jetzigen Kenntnissen nicht erweisen, ob man nur Ernährungsformen oder spezifisch trennbare Formen vor sich hat.

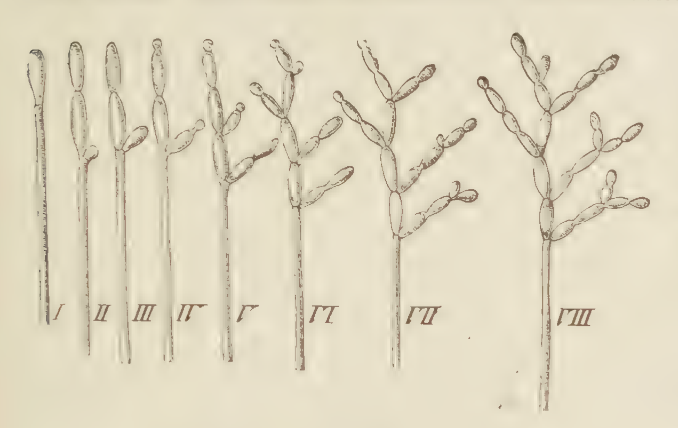


Fig. 80. Cladosporium herbarum.
Konidienträger in der successiven Ausbildung seiner Konidien nach kontinuierlicher Beobachtung auf Traubensaft. *I* Beginn der Konidienabschnürung. *II* nach 3 Stunden. *III* nach weiteren $2\frac{1}{4}$ Std., *IV* nach weiteren $10\frac{1}{4}$ Std., *V* nach weiteren 6 Std., *VI* nach weiteren $2\frac{1}{2}$ Std., *VII* nach weiteren $3\frac{1}{2}$ St., *VIII* noch später. — Vergr. 300. Nach E. Loew.

Die beschriebenen Konidienträger finden sich recht häufig im sogen. Rußtau, dann auf abgestorbenen Pflanzenteilen, an feuchten Kellermauern, Fässern und Bottichen und bedecken diese Flächen mit einem Rasen, der im Jugendzustande hell olivengrün ist und dann allmählich über Olivenbraun in Dunkelbraun sich abtönt. In gleichem Maße verdicken sich die Zellen, füllen sich mit Tröpfchen von fettem Oel und speichern, den Befunden von E. Laurent (1) zufolge, auch Glycogen (s. Bd. I. S. 280) auf.



Fig. 81. Mycosphaerella Tulasnei (E. Jancz.).
Konidien von dem in Fig. 79 abgebildeten Mycelfaden: zwei davon ohne Scheidewand, zwei mit je einer, eine mit zwei Querwänden. — Vergr. 650. Nach Janczewski.

Cladosporium herbarum tritt in der Gärungstechnik nicht selten als Schädling auf. Daß es auf dem Getreide vielfach vorkommt und mannigfache Schädigungen darauf anrichtet, ist bereits im 21. Kapitel des II. Bandes ausführlich berichtet worden. So kann es denn nicht wundernehmen, wenn wir den Pilz auf feucht gelagertem Malze (vergl. Bd. V, S. 163 u. 259) nicht selten finden. Auch die Hopfenpflanze wird ab und zu von *Cladosporium* befallen und geschädigt, namentlich bei feuchter Witterung oder wenn die Pflanzen bereits durch andere Einflüsse dem Angriffe des Pilzes zugänglich sind. Er tritt dann als olivengrüner bis brauner Schimmelrasen auf der Unterseite der Blätter auf. Auch beim Dachbrand des Tabaks (vergl. Bd. V, S. 4) scheint dieser Pilz eine Rolle zu spielen. In den Kellern ist *Cladosporium* ebenfalls keine seltene Erscheinung. Man wird sich also nicht wundern dürfen, wenn man diesen Eindringling in den Korkstopfen der eingelagerten Flaschenweine vor-

findet, wo er durch Hervorbringung von muffig riechenden Stoffwechselprodukten zu dem Entstehen des sogen. Stopfengeschmackes (s. S. 214) der Flaschenweine mit beiträgt. J. Wortmann (1) hat darüber einige Erfahrungen mitgeteilt. Auch in den Kellern der Käsereien richtet 5 dieser Pilz manchmal Unheil an. Er beteiligt sich dort an dem sogen. Schwarzwerden der Käse; vergl. Bd. II, S. 232. Ueber seine Beteiligung an der Taurotte des Flachses und Hanfes vergl. man Bd. III, S. 281.

An dem Verderben der Eier sind nicht immer Bakterien (vgl. 10 Bd. III, S. 100), sondern manchmal gewisse Eumyceten schuld, und von diesen am häufigsten das *Cladosporium herbarum* oder (was ja, nach der zuvor gemachten Darlegung, dasselbe besagt) das *Hormodendron cladosporioides*. Schon im Jahre 1864 hatte Mosler (1) gezeigt, daß man unverletzte Eier von außen her mit *Penicillium glaucum* und *Mucor mucedo* 15 anstecken kann. Wie Zopf (2) angibt, ist durch Montagne aus einem verdorbenen Eie das *Dactylium oogenum* gezüchtet worden, desgleichen durch O. E. R. Zimmermann (1) ein *Macrosporium verruculosum*. Letzterer Autor beobachtete noch *Torula ovicola*, *Penicillium glaucum*, *Stysanus stemonitis* mit dem auf ihm schmarotzenden *Echinobotryum atrum* und 20 *Sporotrichum*-Arten. Endlich wurde von Zopf (2) in derartigen Eiern öfters das *Hormodendron cladosporioides* angetroffen. Zufolge der von Drutzu angestellten Ansteckungsversuche keimen die auf die Außenseite der unverletzten Eischale gelangten (oder dorthin absichtlich gebrachten) Konidien des genannten Pilzes aus, durchdringen die Eischale und das 25 Eihäutchen und entwickeln sich dann zwischen diesem und dem Dotter zu einem klumpigen, gallertigen, dunkelbraunen Mycel, welches das Eiweiß langsam aufzehrt, so daß in besonders schweren Fällen schließlich von diesem gar nichts mehr übrig bleibt und an dessen Stelle ein dicker Pilzmantel den Dotter umhüllt. Wenn infolge des allmählichen Schwindens 30 und Vertrocknens des Eierinhaltes die Außenluft eintritt, kommt es dann zur Hervorbringung von Konidien. Weitere Beiträge zur Kenntnis der Zersetzung der Eier durch *Cladosporium herbarum* sind durch Berlese (1) und Guéguen (1) geliefert worden. Gegen diese Eindringlinge aus der Gruppe der (luftbedürftigen) Eumyceten ist das Firnissen oder das Kalken 35 (s. Bd. III, S. 101) der frischen Eier ein zuverlässiges Abwehrmittel.

Einer Angabe von F. Rathgen (1) zufolge sollen L. Mond und G. Cuboni in der Patina (vergl. S. 257) eine Pilzart nachgewiesen und als *Cladosporium aeris* bezeichnet haben, von welcher sie auf Grund vergleichender Versuche annehmen zu müssen glauben, daß sie an der Zer-40 störung der Bronze sich beteilige. Ueber *Cladosporium butyri* und dessen Beteiligung als Fettspalter am Ranzigwerden der Butter vergleiche man S. 214 des II. Bandes. Ueber *Cladosporium tabaci* findet man eine Bemerkung auf S. 5 des V. Bandes.

§ 60. Dematium pullulans.

45 Es ist schon auf S. 271 bemerkt worden, daß die zur Familie der *Mycosphaerellaceae* (Unterordnung der *Sphaeriales*) gehörige Gattung *Sphaerulina* durch die Mehrzelligkeit der Ascosporen vor der verwandten Gattung *Mycosphaerella* sich auszeichnet. Von jener Gattung kommt für den Gärungsphysiologen nur eine einzige Art in Betracht, 50 nämlich *Sphaerulina intermixta*. Die kleinen Perithecien dieses Pilzes

finden sich auf dem dürren Astwerk der Rosen. Von den Asken dieser Schlauchfrüchte ist einer mit seinen acht mehrzelligen Sporen in der *Fig. 82* abgebildet. Nach erlangter Reife werden die Asken aus dem Perithecium hinausgedrückt; die Ascosporen werden dann durch Verquellung der Ascuswand frei. Gelangen sie nun auf eine günstige Unterlage, so quellen sie alsbald auf, legen in ihren Teilzellen sowohl Längswände als auch Querwände an und lassen überdies auch noch Tochterzellen hervorsprossen, so daß bald eine vielzellige Kolonie zustande kommt. Die Tochterzellen lösen sich auch wieder aus dem Verbande und wachsen dann auf die beschriebene Weise zu einer Tochterkolonie heran. Häufiger noch verläuft die Zellvermehrung überwiegend nach bloß einer Richtung und liefert dann fädige Zellverbände, wie einer in *5* der *Fig. 82* abgebildet ist. Diese Verbände haben große Aehnlichkeit mit jenem Hyphomyceten, welcher durch A. de Bary (1) unter dem Namen *Dematium pullulans* beschrieben worden ist und in der Natur auf süßen Früchten, in manchen Arten von Rußtau und auf absterbenden Pflanzenteilen sich findet. Brefeld (1) hat nun diesen Hyphomyceten für identisch mit jener Konidienfruktifikation erklärt und also das *Dematium pullulans* dem Formenkreis der *Sphaerulina intermixta* zugeteilt. Zufolge Alb. Klöcker und H. Schiönning (4) besteht jedoch zwischen diesen zwei Formen ein unverkennbarer Unterschied. Endgültige Entscheidung in dieser Frage zu treffen, würde wohl erst dann möglich sein, wenn es gelänge, jenen Hyphomyceten zur Bildung von Perithecien zu veranlassen, was aber bisher noch niemandem geglückt zu sein scheint. Immerhin wird man bis auf weiteres das *Dematium pullulans*, wenn schon nicht in den Formenkreis der *Sphaerulina intermixta* selbst, so doch in denjenigen einer (noch unbekannten) verwandten Art einzureihen haben. Mit der Spezieskenntnis liegt es auf diesem Gebiete ja noch sehr im Argen. Groß ist die Aehnlichkeit der Formen, und zwar nicht nur zwischen dem

Fig. 82. *Sphaerulina intermixta* Brefeld.
1 Ein Ascus mit seinen acht reifen Sporen;
2 Schwellung und Auskeimung von drei Ascosporen;
3 Von diesen abgegliederte Sproßzellen, in Vermehrung begriffen;
4 Kolonien davon;
5 Fädiger Zellverband; Dematium-Form;
6 Gemmen.
Vergr. 350. Nach Brefeld.

Dematium pullulans und der Konidienfruktifikation der *Sphaerulina intermixta*, sondern auch noch zwischen diesen zweien und den Konidienfruktifikationen der durch Brefeld beschriebenen *Dothidea ribesia* und *D. puccinioides*, der durch Zopf (1) untersuchten *Fumago salicina*, welche 5 den Hauptbestandteil des echten Rußtaues ausmacht, dann dem *Cladosporium herbarum* u. a. Am nächsten steht das *Dematium pullulans* aber ohne Zweifel der *Sphaerulina intermixta*, wodurch auch dessen Betrachtung an dieser Stelle gerechtfertigt wird. Seinetwegen allein sind wir auf den eben genannten Ascomyceten zu sprechen gekommen. Des letzteren 10 Schlauchfrüchte hingegen, die nur außerhalb Flüssigkeiten entstehen, haben für den Gärungsphysiologen kaum eine andere als die zuvor gekennzeichnete entwicklungsgeschichtliche Bedeutsamkeit. Ganz verkehrt sind die Ansichten früherer Forscher, welche *Dematium* mit den echten Hefen in Beziehung setzen wollten (vergl. S. 144 u. 146).

15 Gegenstand der folgenden Zeilen ist also ausschließlich die als *Dematium pullulans* bezeichnete Konidienfruktifikation. Eingehende Untersuchungen über deren Aufbau verdanken wir insbesondere auch E. Loew (1).

Bringt man einen von den in ihrer Gestalt an Hefenzellen erinnernden Sprossen (Konidien) des *Dematium pullulans* unter günstige Ernährungs-20 verhältnisse, dann wächst er zu einem stattlichen Mycel heran, dessen einzelne Glieder wieder reichlich ellipsoidische Konidien hervortreiben. Diese werden, zufolge der durch W. Schostakowitsch (1) gemachten Feststellungen betreffend die Abhängigkeit der Bildung der Sproßzellen von äußeren Bedingungen (vergl. Bd. I, S. 195), aber in dem Falle nicht 25 hervorgebracht, wenn das Mycel in einer starken Lösung von Traubenzucker oder Rohrzucker wachsen muß. O. von Skerst (1) bestimmte den Grenzwert dafür zu ungefähr 50 Proz. Eine Temperatur von 30—31° C wirkt in dem gleichen Sinne hemmend. Doch kann man durch allmähliches und von der Zimmertemperatur an aufsteigendes 30 Angewöhnen an höhere Wärmegrade endlich eine Zucht gewinnen, von der auch bei 30° noch Konidien vom Mycel abgegliedert werden. Bei Wärmegraden von 50—55° C aber wird das Mycel in je nach dem Alter verschiedener Zeit abgetötet (vergl. Bd. V, S. 66).

Gestattet man der Luft freien Zutritt zur Nährlösung, so wandeln 35 sich in der Folge die bisher schlanken, farblosen Zellen des Mycels in kurze, bauchig aufgetriebene Gebilde (Gemmen, vergl. Bd. I, S. 197) um, deren Membran sich verdickt und olivengrüne bis braune Färbung annimmt. Die Stärke des Farbentones hängt übrigens, zufolge O. von Skerst (1), von dem Gehalte der Nährlösung ab und steigt mit diesem 40 an. Gleichzeitig sammelt sich im Zellinhalt eine reichliche Menge von Fett in Gestalt zuerst kleiner und später großer Oeltropfen an, welche durch ihr hohes Lichtbrechungsvermögen, also ihren hellen Glanz, sich bemerkbar machen. Gerade durch diesen letzteren können die Oeltröpfchen bei weniger genauer Beobachtung leicht mit endogenen Sporen 45 verwechselt werden. Vor dieser Täuschung hatte schon E. Laurent (2) gewarnt, wie auch später dann O. Seiter (1). Wahrscheinlich durch sie wurde auch Johan-Olsen (1) zu einer irrtümlichen Meinung gebracht, welche durch Alb. Klöcker und H. Schiönning (2) dann berichtigt worden ist. Manchmal tritt in den (auf dem Wege der Querteilung der 50 Mycelzellen entstandenen) Gemmen dann nachher auch noch eine Längswand auf. Zu einem noch späteren Zeitpunkte kann man nicht selten eine Verschleimung der äußeren Schichten der dicken Zellwände bemerken, die so weit gehen kann, daß die Nährflüssigkeit fadenziehend

wird; vergl. darüber Bd. V, S. 238. Auf dem eben dargelegten Wege entwickelt sich eine Zucht des *Dematium pullulans*, z. B. in Bierwürze, zu einer grünbraunen bis schwarzgrünen, dünnen aber zähen, papierähnlichen Haut an der Oberfläche der Flüssigkeit, während auf dem Grunde der letzteren sich ein Absatz von hefenzellähnlichen Konidien und Konidienkolonien ansammelt. 5

Je nachdem den Gemmen eine gute oder aber eine kärgliche Nahrung geboten wird, wachsen sie entweder zu einem Mycel aus, welches dann seitlich Sprosse abschnürt, oder aber sie treiben solche unmittelbar hervor. 10

Das *Dematium pullulans* liefert auch ein Beispiel zur Darlegung der schon auf S. 170 des I. Bandes besprochenen Erscheinung der Durchwachsung von Zellen. Es dringt dabei an ein und demselben

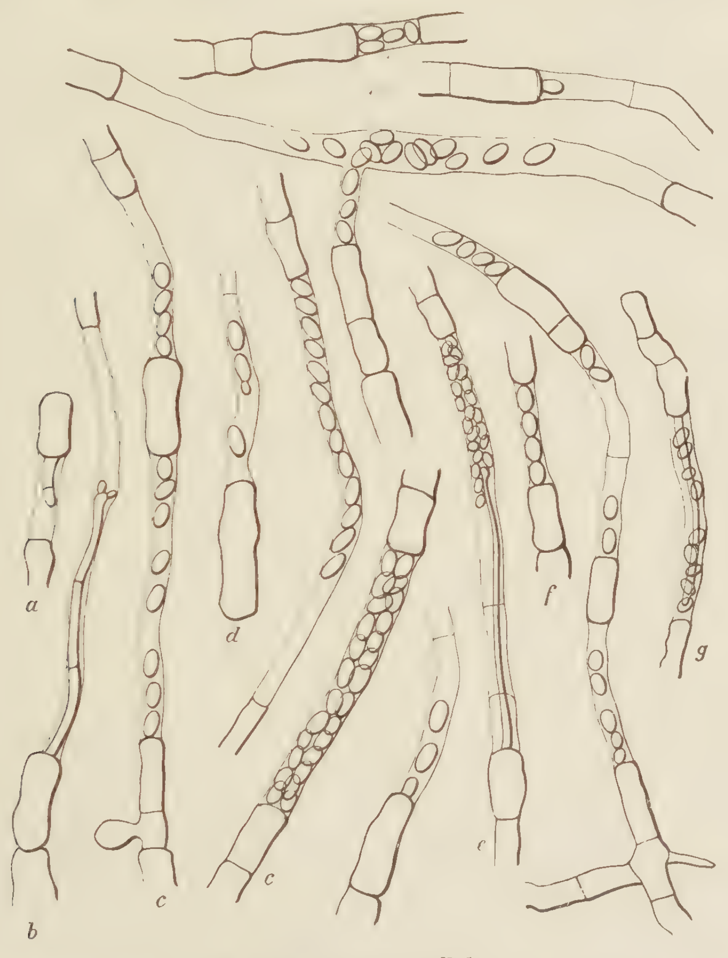


Fig. 83. Dematium pullulans.
In *a*, *b*, *c*, *g* sind Fäden in die benachbarte Zelle hineingewachsen, welche teilweise Konidien abschnüren. In *c* haben die Querwände an beiden Enden der Zelle Konidien erzeugt, *f* kann ein viersporiges Sporangium vortäuschen, in *d* sproßt eine Konidie hefenartig aus. — Vergr. 500. Nach Klöcker und Schiönning.

Mycele die eine Zelle in eine zweite (benachbarte) ein. Beim *Dematium pullulans* insbesondere, welches ja, wie zuvor gesagt, zur Abschnürung von Sproßzellen sehr geneigt ist, wird dann also im Innern der Wirtszelle nach und nach eine mehr oder weniger große Anzahl von annähernd 5 ellipsoidischen Zellen entstehen, die nun ihrerseits wieder durch Sprossung sich vermehren können, so daß unter günstigen Umständen ein derart erfüllter Faden bei einem mit seiner Entstehungsweise unbekannten Beobachter leicht die Meinung erregen kann, daß hier eine Ascosporenbildung vor sich gegangen sei (s. *Fig. 83*). Solche irrtümliche Deutung 10 ist schon mehreren Forschern unterlaufen, so O. Johan-Olsen (1) an dem von ihm als *Dematium casei* bezeichneten Pilze, dann Alfr. Jörgensen (1) und Fr. Weleminsky (1) am *Dematium pullulans* selbst. Wir verdanken Alb. Klöcker und H. Schiönning (2 u. 4) die oben gegebene Aufklärung des wahren Sachverhaltes. Durch die Richtigstellung der Deutung jener 15 Erscheinung entfällt auch die daraus gezogene irrtümliche Behauptung der Zugehörigkeit des *Dematium pullulans* zur Gruppe der Exoasceen oder ähnlicher niedriger Ascomyceten.

Infolge seines häufigen Vorkommens auf Stroh und somit auch im Staube der Luft der Kuhställe wird das *Dematium pullulans* voraus- 20 sichtlich ein nicht seltener Gast in der Milch sein. Tatsächlich ist es durch Adametz (1 u. 2) darin auch öfter nachgewiesen worden. Beim Verkäsen geht dieser Pilzgehalt dann zum größeren oder geringeren Teil in den Bruch über. Die Wirkungsweise dieses Pilzes darin bedarf noch der Aufklärung. O. Johan-Olsen (1) hat solche zu erbringen ver- 25 meint. Er hatte im norwegischen Gammelost (s. Bd. II. S. 185) einen Hyphomyceten aufgefunden, den er zwar nicht für *Dematium pullulans*, wohl aber doch für einen nahen Verwandten desselben hält und als *Dematium casei* bezeichnet hat. Dieses solle, einer zweiten Mitteilung (2) zufolge, den scharf bitteren Geschmack erzeugen, welcher jenem Käse 30 eigentümlich ist. Eine Nachprüfung dieser Angaben durch A. Klöcker und H. Schiönning (1) hat nun aber zur Feststellung geführt, daß dieser Pilz gar nicht zur Gattung *Dematium* sondern eher zu *Monilia* oder zu *Oidium* gehört.

Auch im Braugewerbe tritt das *Dematium* auf; es findet sich auf 35 der Gerste und ab und zu auch in der Würze vor (s. Bd. V. S. 239). Ueber das Vorkommen dieses Pilzes auf den Trauben und Obstfrüchten und also auch im Moste wird das 14. Kapitel des V. Bandes nähere Angaben bringen.

Literatur

zum Kapitel Cladosporium herbarum und Dematium pullulans.

*__Adametz,__ L., (1) Milchztg., 1891, Bd. 20, S. 237; 1892, Bd. 21, S. 205. — (2) Ebenda, 1889, Bd. 18, S. 941. *__Bary,__ A. de, (1) Morphologie der Pilze etc., 1866. *__Bauke,__ H., (1) Nova Acta Acad. Leop.-Carol. etc., 1876, Bd. 38. — (2) Bot. Ztg., 1877, Bd. 35, S. 313. *__Berlese,__ (1) Bullet. Soc. mycologique de France, 1895, Bd. 11, S. 34. *__Brefeld,__ O., (1) Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie, 1891, Heft 10. *__Fresenius,__ G., (1) Beiträge zur Mykologie, 1853, Bd. 1, S. 22. *__Gibelli und Griffini,__ (1) Arch. Laborat. di Bot. crittog. Pavia, 1874, Bd. 1, S. 53. *__Guéguen,__ (1) Bullet. Soc. mycologique de France, 1898, Bd. 14, S. 88. *__Janczewski,__ E., (1) Anzeiger d. Akad. d. Wiss. in Krakau, 1893, S. 271. — (2) Ebenda, 1894, S. 187. *__Jörgensen,__ A., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 860. *__Johan-Olsen,__ O., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1897, Bd. 3, S. 273. — (2) Ebenda, 1898, Bd. 4, S. 161. *__Klöcker,__ A., und __Schiönning,__ H., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1895, Bd. 1, S. 777; 1896, Bd. 2, S. 185. — (2) Ebenda, 1898, Bd. 4, S. 460. — (3) Ebenda, 1899, Bd. 5, S. 505; 1901, Bd. 7, S. 152. — (4) Comptes rendus de Carls-

berg, 1900, Bd. 5, S. 47. ***Kohl,** F. G., (1) Bot. Centralbl., 1883, Bd. 16, S. 26. ***Laurent,** E., (1) Ann. Soc. belg. de Microsc., 1890, Bd. 14, S. 29. — (2) Ann. Pasteur, 1888, Bd. 2, S. 603. ***Loew,** E., (1) Jahrb. wiss. Bot., 1867, Bd. 6, S. 467. — (2) Ebenda, 1870, Bd. 7, S. 472. ***Lopriore,** G., (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1892, Bd. 10, S. 72. ***Mosler,** F., (1) Virchows Archiv, 1864, Bd. 29, S. 510. ***Rathgen,** F., (1) Dinglers Journ., 1896, Bd. 301, S. 44. ***Saccardo,** P. A., (1) Sylloge Fungorum etc., 1886, Bd. 4. ***Schostakowitsch,** W., (1) Flora, 1895, Bd. 81, S. 362. ***Seiter,** O., (1) Studien ü. d. Abstammung d. Saccharomyceten u. Untersuchungen ü. Schizosaccharomyces octosporus. Dissert., Erlangen 1886; Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1896, Bd. 2, S. 301. ***Skerst,** O. **von,** (1) W. f. Brauerei, 1898, Bd. 15, S. 354. ***Sorauer,** P., (1) Handbuch der Pflanzenkrankheiten, 3. Aufl., 1906, Bd. 2. ***Tulasne,** L. R. u. Ch., (1) Selecta fungorum carpologia. Paris 1861, Bd. 2, S. 261. ***Viala,** P., (1) Les maladies de la vigne. 3. Aufl., Paris 1893. ***Weleminsky,** F., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1899, Bd. 5, S. 297. ***Wortmann,** J., (1) Ber. ü. d. Verhandl. d. 15. Deutsch. Weinbau-Kongresses in Heilbronn 1896, S. 44; Weinbau u. Weinhandel, 1896, Nr. 45. ***Zimmermann,** O. E. R., (1) Sechster Ber. d. naturw. Ges. Chemnitz 1878. ***Zopf,** W., (1) Nova Acta Acad. Leop.-Carol. etc., 1878, Bd. 40, Nr. 7. S. 20. — (2) Die Pilze. Breslau 1890.

———

Fünfter Abschnitt.

Allgemeine Morphologie, Physiologie und Systematik technisch wichtiger Sproßpilze aus der Gruppe der Fungi imperfecti.

Manuskript-Einlauf: 6. Jan. 1906.

13. Kapitel.

Torulaceen, Rosahefen und schwarze Hefen.

Von Prof. Dr. H. Will.

§ 61. Geschichtliches. Umgrenzung. Abstammung.

Mit dem Namen *Torula* bezeichnete Pasteur (1) im Jahre 1862 eine Gruppe von Pilzen, welche sich wie die Bierhefe durch Sprossung vermehren und eines typischen Myceliums entbehren. Die Tafel III in seinen „Études sur la bière" gibt ein sehr gutes und charakteristisches Bild von zwei *Torula*-Arten mit kugelförmigen Zellen. Hiernach kann wenigstens in Beziehung auf eine der Gruppen von Sproßpilzen, welche Pasteur unter dem Gattungsnamen *Torula* zusammenfassen wollte, kein Zweifel bestehen.

Weiterhin bildet Pasteur in 6 Figuren noch andere Torulaformen ab, von welchen die in Fig. 1 und 2 dargestellten ebenfalls kugelförmige Zellen besitzen. Die in Fig. 4 gezeichnete Form gleicht den bei *Dematium* auftretenden Sproßzellen, wie auch Hansen (5) bemerkt. Es dürfte zweifelhaft sein, ob sie überhaupt zu den Torulaceen zu rechnen ist und eine besondere Gruppe bildet. Allerdings kommen ähnliche zugespitzte Zellen bei manchen *Torula*-Arten mit gemischter Zellform vor. Fig. 3 und 6 jener Tafel stellen dagegen Arten vor, bei welchen langgestreckte, dünne Sproßzellen neben gedrungeneren (bis kugelförmigen) auftreten. Sie gleichen bis zu einem gewissen Grade den Sproßpilzen, welche jetzt unter dem Gattungsnamen *Mycoderma* zusammengefaßt werden. Pasteur stellt auch folgerichtig *Mycoderma vini* zu den Torulaceen. Der Unterschied zwischen *Mycoderma vini* und den übrigen Torulaformen besteht nach seiner Anschauung nur in einem besonderen Aufbau der Zellen

sowie in einer fettigen Beschaffenheit, welche die Zellen an der Oberfläche festhält. Dieses Merkmal ist aber nicht durchgreifend.

Die in Fig. 5 jener Tafel abgebildete Art ist nach ihrer Form einer gewöhnlichen Hefe (*Saccharomyces*) ähnlich, doch dürfte sie gleichfalls noch zu den Torulaceen gehören. 5

Pasteur selbst gibt seinem Zweifel darüber Ausdruck, ob alle abgebildeten Formen ebensoviele verschiedene Arten darstellen, wobei er darauf hinweist, daß die langgestreckten Zellen auch kleine, kugelförmige erzeugen, wie er sie in Fig. 1 und 2 abgebildet hat. Er vertritt die Anschauung, es könnten von einer *Torula*-Art mit gemischter Zellform 10 verschiedene Varietäten gezüchtet werden, wenn die verschiedenen Zellformen zur Aussaat gelangten. Wenn er auch selbst keine Beweise für diese beibringt, so hat sie doch ihre volle Berechtigung, um so mehr, als wir durch neuere Untersuchungen wissen, daß es Torulaformen gibt, welche unter bestimmten Kulturbedingungen sich fast ausschließlich mit 15 kleinen, mehr oder weniger kugelförmigen Zellen vermehren und langgestreckte Zellformen nur in verhältnismäßig geringer Zahl erzeugen, während unter anderen Bedingungen letztere mehr in den Vordergrund treten.

Als ein Hauptmerkmal seiner in den Fig. 1—6 abgebildeten *Torula*- 20 Formen bezeichnet Pasteur, daß sie ebensowenig wie *Mycoderma* alkoholische Gärung hervorrufen können.

Obgleich also Pasteur schon eine Reihe der Hauptrepräsentanten der Torulaceen mit ziemlicher Sicherheit gekennzeichnet hat, trotzdem er keine absoluten Reinkulturen vor sich hatte, so ist doch deren Ab- 25 grenzung gegenüber den Saccharomyceten eine unsichere und ungenügende; es können sich unter ihnen auch Saccharomyceten mit schwachem Gärvermögen befinden.

Eine schärfere Trennung wurde erst durch die Untersuchungen von Hansen (8) ermöglicht. Dieser bezeichnet mit dem Namen *Torula* Sproß- 30 pilze, welche weder Endosporen noch typische Schimmelvegetationen bilden. Sie unterscheiden sich also sowohl einerseits von den Saccharomyceten wie auch andererseits von *Monilia*, *Dematium* und anderen Hyphomyceten mit Sproßzellbildung.

Hansen schränkt durch diese Definition den Formenkreis der 35 Torulaceen ganz wesentlich ein. Er rechnet zu ihnen nur Arten mit mehr oder weniger kugelförmigen Zellen; allerdings bilden einige seiner Arten in Hautvegetationen auch langgestreckte, wurstförmige. Jedenfalls sind durch diese Einschränkung alle mycodermaähnlichen Sproßpilze ohne Sporenbildung sowie *Mycoderma* selbst von den Torulaceen 40 ausgeschlossen. Hierzu kommt noch, daß die Pasteur'schen Torulaformen überhaupt keine oder nur schwache alkoholische Gärung hervorrufen, während die von Hansen aufgestellten Arten alle Abstufungen darbieten: einige gären ziemlich stark. Die *Torula*-Arten von Hansen (vergl. Bd. I, S. 172 u. 173) können also mit denjenigen von Pasteur 45 nicht ohne weiteres in einer Gruppe vereinigt werden.

Die Sporenbildung schließt diejenigen Saccharomyceten, welche, wie die von P. Lindner (3) aufgestellte Art *Torulaspora Delbrücki* (s. S. 181) und eine andere von ihm in dem Schleimfluß einer Eiche gefundene, zeitweise streng kugelförmige Zellen mit einem regelmäßig auftretenden großen 50 „Fetttropfen" wie typische Torulaceen bilden, von letzteren aus.

Durch die von Hansen aufgestellten diagnostischen Merkmale erscheinen zwar die Torulaceen schärfer, als dies von Pasteur geschehen

ist, umgrenzt; neuere Untersuchungen haben jedoch Schwierigkeiten auch für diese Umgrenzung ergeben. Die Torulaceen trennt von den Saccharomyceten nur ein negatives Merkmal, der Mangel der Sporenbildung: im übrigen haben sie sowohl in morphologischer wie in physiologischer Beziehung mit den Saccharomyceten, wie auch mit anderen nicht sporenbildenden Gruppen, wie *Mycoderma*, sehr vieles gemeinsam. Hansen selbst hat aber gezeigt, daß es Saccharomyceten gibt, welche durch eine bestimmte Behandlungsweise das Sporenbildungsvermögen verlieren (vergl. S. 159 u. f.). Ob eine derartige Variation auch unter natürlichen Verhältnissen stattfindet, ist zwar nicht nachgewiesen, jedoch sehr wohl möglich. Bei der Unkenntnis der Abstammung derartiger Formen müssen sie zu den Torulaceen gestellt werden. Andererseits ist bekannt, daß bei manchen Saccharomyceten Sporenbildung ungemein schwer und selten eintritt; es müssen offenbar ganz bestimmte, bis jetzt kaum gekannte Bedingungen erfüllt sein, wenn solche entstehen sollen.

Meine eigenen Untersuchungen haben mir außerdem gezeigt, daß es typische Torulaceen gibt, welche mit den gewöhnlich geprüften Zuckerarten keine alkoholische Gärung hervorzurufen vermögen, also in dieser Beziehung mit denjenigen von Pasteur übereinstimmen. Ferner sind mir Formen bekannt geworden, welche, wie oben angegeben, unter bestimmten Kulturbedingungen sich fast ausschließlich mit kleinen, mehr oder weniger kugelförmigen, alle Merkmale der Torulaceen in sich vereinigenden Zellen vermehren und langgestreckte Zellindividuen nur in verhältnismäßig geringer Zahl erzeugen. Unter anderen Verhältnissen treten letztere mehr in den Vordergrund und bilden damit den Uebergang zu solchen Arten, welche stets neben kugelförmigen und ovalen auch pastoriane Zellen (vergl. S. 7) und mycelartige Verbände von solchen erzeugen. Im übrigen besitzen sie Gärvermögen und unterscheiden sich hierdurch von den *Mycoderma*-Arten.

Auf Grund meiner eigenen Untersuchungen ziehe ich im Gegensatz zu Hansen den Formenkreis der Torulaceen weiter und nehme in diesen auch solche Arten auf, wie sie schon Pasteur gekennzeichnet hat.

Bei den folgenden Betrachtungen sind also nicht nur solche Sproßpilze ohne bis jetzt nachweisbare Sporenbildung zusammengefaßt, welche nach den vorliegenden Beobachtungen ausschließlich mehr oder weniger rundliche und ovale Zellen mit oder ohne Gärvermögen erzeugen (erste Untergruppe), sondern auch solche, welche gemischte, auseinander hervorgehende Zellformen bilden, von den *Mycoderma*-Arten sich jedoch durch das Gärvermögen unterscheiden (zweite Untergruppe). Die Monilien sind von diesem Formenkreis durch den Besitz eines typischen Mycels mit Querwänden getrennt; vergl. über diese das 16. Kapitel. Prinzipiell besteht kein Grund, die sogen. Rosahefen, wenigstens teilweise, von den Torulaceen auszuschließen. Allerdings sind sie bis jetzt noch kaum eingehender studiert worden, jedoch stimmen einige, so weit bis jetzt bekannt, morphologisch in vielen Beziehungen mit den Torulaceen überein. Die Farbstoffbildung kann jedenfalls kein ausreichender Grund für ihre Abtrennung sein, da wir durch die Beobachtungen von Kossowicz (1), welche von R. Schander (1) bestätigt wurden, wissen, daß bei manchen Saccharomyceten, welche unter gewöhnlichen Verhältnissen farblos sind, unter bestimmten Bedingungen (bei Gegenwart von Magnesiumsalzen) ein roter Farbstoff entsteht (vergl. S. 86). Außerdem gibt es typische Torulaformen, welche nur unter gewissen Vegetationsbedingungen, wie in alten Hautbildungen auf Nährflüssigkeiten sowie in Riesenkolonien,

in verschiedener Weise, darunter auch rosa gefärbt erscheinen. Die Farbstoffbildung ist überhaupt kein konstantes Merkmal. Aus praktischen Gründen sollen in dem vorliegenden Kapitel aber die sogen. Rosahefen sowie andere gefärbte Sproßpilze gesondert, und zwar in dessen § 64, behandelt werden.

Schon HANSEN (5) hat den Gedanken ausgesprochen, daß die Torulaceen nur Entwicklungsstadien anderer Pilze seien. Bekannt ist, daß die Konidien mancher Ustilagineen (s. S. 145) unter Sprossung in geeigneten Nährlösungen eine selbständige Existenz führen können. Ueberhaupt treten Sproßzellen bei verschiedenen Gruppen von Pilzen auf; möglicherweise sind die gleichen biologischen Verhältnisse Ursache der gleichen oder ähnlichen äußeren Erscheinung. Die Gruppe *Torula* ist keine natürliche und nur eine vorläufige.

Für eine pathogene Rosahefe wollen E. KLEIN und M. GORDON (1) die Abstammung von *Puccinia suaveolens* nachgewiesen haben; dagegen stellte R. MEISSNER (1) durch einen Vergleich seiner sechs Schleimhefenarten (s. S. 131) mit den Sproßzellen von Exoascussporen, mit welchen sie in Zusammenhang zu stehen schienen, wesentliche Unterschiede zwischen jenen und den Sproßzellen von *Exoascus deformans* fest. Bemerkt sei noch, daß nach LAURENT (1) die Sproßformen von *Cladosporium herbarum* (s. S. 273) durch Insolation in eine Rosahefe übergehen sollen. Auch WINKLER (1) will durch eine bestimmte Züchtungsmethode aus Mucorsporen „Hefenzellen" erhalten haben, die keine Sporen bilden und die er deshalb vorläufig bei den Torulaceen untergebracht wissen will. So annehmbar der Gedanke erscheint, daß die hierher gehörigen Organismen nur Sproßformen der Konidien oder Sporen höherer Pilze sind, so bedürfen diesbezügliche Angaben noch sehr einer kritischen Nachprüfung.

Bei der Zusammenfassung aller teils unter dem Gattungsnamen *Torula* teils unter einer allgemeinen Bezeichnung, wie Hefe, weiße Hefe usw., in der Literatur bekannt gewordenen Sproßpilze ohne Sporenbildung ist es oft sehr schwer, ja unmöglich, zu entscheiden, ob sie der hier zu behandelnden Gruppe angehören. Einmal ist zu berücksichtigen, daß der Name *Torula* zu verschiedenen Zeiten sehr verschiedene Organismen bezeichnete und noch bezeichnet. Ursprünglich für Hyphomyceten mit rosenkranzförmig in einfachen oder verzweigten Ketten angeordneten Konidien bestimmt, wurde er im Jahre 1838 von TURPIN für die Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), welche er *Torula cerevisiae* benannte, benutzt. COHN bezeichnete sogar die von der Bakteriengattung *Micrococcus* gebildeten rosenkranzförmigen Ketten als *Torula*. Heute bilden die *Toruleae* eine Untergruppe der *Dematiaceae* (s. Bd. I, S. 215); vergl. A. ENGLER und K. PRANTL (1). Die zu dieser Untergruppe gehörigen Arten, wie beispielsweise *Torula monilioides* CORDA, welche F. LUDWIG (1) in dem Schleimfluß von Bäumen gefunden hat, stehen außerhalb des für uns hier in Betracht kommenden Formenkreises.

Außerdem gibt es, wie schon erwähnt, Saccharomyceten, welche manchen Torulaformen sehr ähnlich sind. Die Angabe: „Sporenbildung wurde nicht beobachtet", gibt durchaus noch keine Gewähr dafür, daß nicht trotzdem unter bestimmten Bedingungen Sporenbildung erfolgt. Für manche Beobachter sind alle einzelligen Pilze, welche sich durch Sprossung vermehren, zumal dann, wenn sie gleichzeitig Gärungserscheinungen hervorrufen, Hefe gleich Saccharomyceten, und sie bezeichnen auch die von ihnen beschriebenen Arten als *Saccharomyces*.

Meist sind auch die Beschreibungen überhaupt sehr unzulänglich, und es läßt sich nur aus einzelnen charakteristischen Erscheinungen mit einiger Wahrscheinlichkeit erschließen, ob die betreffenden Sproßpilze zur Gruppe *Torula* gehören oder nicht. Nicht viel besser steht es mit der Abgrenzung der bisher etwas genauer untersuchten Arten, und der Versuch, diese in ein System zu bringen, ist zur Zeit noch völlig aussichtslos.

Aus dem gleichen Grunde ist es auch schwierig, eine Entscheidung darüber zu treffen, ob die verhältnismäßig kleine Gruppe von Sproßpilzen ohne bis jetzt nachweisbare Sporenbildung, für welche eine sehr charakteristische Eigenschaft die Vergärung von Milchzucker (vergl. S. 293) ist, zu den Torulaceen gehört. Von solchen sind beschrieben worden: Zuerst durch Pirotta und Riboni (1) der sogen. *Sacch. galactocola*, durch Duclaux (1) einer, durch Adametz (1) der sogen. *Sacch. lactis*, durch Beijerinck (1 u. 3) der sogen. *Sacch. Kefyr* und der sogen. *Sacch. tyrocola*, dann einige durch Weigmann (1) und Grotenfelt (1), dann insbesondere aber durch E. Kayser (2) die *Torula* Duclaux', der sogen. *Sacch. lactis* Adametz und eine von ihm aus Milch isolierte Art, außerdem durch L. Ch. Mix (1) eine Art, durch Adametz (2) in Gemeinschaft mit W. Winkler, dann durch Nicola Bochicchio (1) der *Lactomyces inflans caseigrana*, durch Freudenreich (1) der sogen. *Sacch. Kefir*, durch A. Kalanthar (1), durch Harrison (1) die *Torula amara*, durch O. Jensen (1) und durch P. Mazé (1), welcher auch die *Torula* Duclaux', den sogen. *Sacch. lactis* Adametz und die von Kayser beschriebene Art in seine Untersuchungen einbezog. Eine eingehende Behandlung haben der sogen. *Sacch. lactis* Adametz und der sogen. *Sacch. tyrocola* Beijerinck durch Heinze und Cohn (1) erfahren. Von letzteren beiden Arten ist es wohl zweifellos, daß sie zu den Torulaceen gehören, und zwar der sogen. *Sacch. lactis* zur zweiten und der sogen. *Sacch. tyrocola* zur ersten Untergruppe. Dementsprechend werden beide Sproßpilze auch richtiger als *Torula lactis* und *Torula tyrocola* benannt werden müssen. Zweifelhaft bleibt es, ob die Kefirhefen, welche im übrigen den Torulaceen zuzurechnen sind, überhaupt hierher gehören. Nach den übereinstimmenden Angaben von Adametz, Freudenreich und Heinze (1) vermögen sie Milchzucker, wenigstens für sich allein, nicht zu vergären. Sehr wahrscheinlich enthalten die Kefirkörner verschiedene Arten von Sproßpilzen, und es ist anscheinend der sogen. *Sacch. Kefyr* Beijerinck gar kein regelmäßiger Bewohner von jenen. Nicht unwahrscheinlich hat auch Boersch (1), welcher bei dem sogen. *Sacch. Kefyr* Sporenbildung beschreibt, eine nicht immer in den Kefirkörnern vorkommende Art vor sich gehabt. Die Hauptmenge der Sproßpilze, welche in den Kefirkörnern vorkommen, entwickelt, soweit ich sie kenne, keine Sporen. Ob alle beschriebenen Formen auch verschiedene Arten darstellen, ist ungewiß. Die vergleichenden Untersuchungen von E. Kayser haben ergeben, daß die Torula Duclaux', der sogen. *Sacch. lactis* Adametz und die von ihm selbst aus Milch isolierte Art in chemisch-physiologischer Beziehung sehr verschiedene und beständige Eigenschaften besitzen. Der sogen. *Sacch. Kefyr* Beijerinck entspricht ziemlich genau dem sogen. *Sacch. lactis* Adametz, während möglicherweise der sogen. *Sacch. tyrocola* mit der *Torula* Duclaux' identisch ist. Ein Zweifel über die Verschiedenheit von *Sacch. lactis* Adametz und *Sacch. tyrocola* Beijerinck kann nach den Untersuchungen von Heinze und Cohn kaum bestehen.

§ 62. Vorkommen, Verbreitung und Morphologie der Torulaceen.

Die Torulaceen sind sehr weit verbreitet. Die Häufigkeit ihres Vorkommens in der Luft hängt jedenfalls mit besonderen Verhältnissen, in erster Linie mit der Bebauung des Landes, insbesondere mit Weinbergen und Obstgärten, deren Früchte ihnen günstige Entwicklungs- 5 bedingungen bieten, zusammen. Hansen (1) fand sie in der Freilandluft unter Fruchtbäumen während der Monate Juli bis November, am häufigsten im September, dagegen fehlten sie im Mai, Juni und Dezember. Meine eigenen Untersuchungen stimmen bezüglich der Häufigkeit des Vorkommens mit diesen Angaben überein. Ihre normale Ueberwinterungs- 10 stätte ist nach den Beobachtungen Hansen's (1) wie bei den Saccharomyceten der Erdboden.

Auch auf Feld- und Gartenfrüchten, überhaupt auf Pflanzen aller Art siedeln sich die Torulaceen an und finden anscheinend nicht nur bei der Verwesung sondern auch bei der technischen Verarbeitung 15 einiger von diesen zum Zweck der Konservierung, wie beim Einsäuern der Gurken und Bohnen sowie bei der Sauerkrautgärung (vergl. 19. Kap. d. II. Bds.), günstige Vegetationsbedingungen.

Möglicherweise gehören auch die bei der Tabaksfermentation (s. Bd. V, S. 19) und bei der Teegärung gefundenen Hefenarten zu den Torulaceen. 20

Mit den Nahrungsmitteln gelangen sie auch in den Magen, in welchem sie bei dessen Erkrankungen beim Menschen (Magengärung, Magenerweiterung) vorgefunden wurden.

Der Darmtraktus der Nonnenraupe war während ihres massenhaften Auftretens in Bayern zeitweise dicht mit den Zellen verschiedener 25 Torulaceen erfüllt.

Die Torulaceen nisten sich in organischen Substanzen aller Art ein und entwickeln sich oft in geradezu erstaunlichen Mengen. Beispielsweise bestehen die dicken weißen bis weißgelben Beläge auf Dauerwurstwaren oft ausschließlich aus diesen Organismen. Milch, Butter und Käse 30 bieten ihnen ebenfalls günstige Vegetationsbedingungen. In Brot entwickeln sie sich zuweilen ungemein reichlich.

Die Gewässer unseres Kontinents sind, wie insbesondere die sehr zahlreichen für Brauereizwecke ausgeführten biologischen Untersuchungen beweisen, oft sehr reich an Sproßpilzen, welche zum Formenkreis der 35 Torulaceen gehören. Selbst im Meerwasser befinden sich Sproßpilze. Zumal in den nördlichen Gebieten scheinen sie konstant vorzukommen und es befinden sich unter ihnen offenbar zu den Torulaceen gehörige Arten.

Ein Hauptfundort sind die milchwirtschaftlichen und Gärungs-Betriebe 40 aller Art, und es kommen diese Sproßpilze nicht nur auf den verarbeiteten Rohmaterialien und in den aus diesen hergestellten Produkten in allen Stadien, sondern auch in der Luft aller Räume, an den Wandungen der Gär- und Lagerräume sowie an den Gerätschaften oft in ganz enormer Entwicklung vor. 45

Die **Form** und **Größe** der Zellen ist insbesondere in der zweiten Untergruppe eine sehr verschiedene. Bei der gleichen Art variiert in der gleichen Nährlösung die Zellform oft nur unbedeutend, zuweilen jedoch nicht unbeträchtlich, und es finden sich neben rein kugelförmigen auch ovale und selbst gestreckt-ovale sowie langgestreckte, pastoriane 50 Zellen, insbesondere in sehr alten Kulturen, vor. Bei den Arten mit durchschnittlich kugelförmigen Zellen wachsen einzelne auch mit wurst-

förmigen oder unregelmäßig gestalteten Tochterzellen aus; selbst solche, welche dem *Sacch. apiculatus* ähnlich sind, werden bei einigen Arten regelmäßig beobachtet. Die Reaktion und Zusammensetzung der Nährlösung, vor allem aber die Gegenwart bestimmter Zuckerarten ist auf 5 die Form der Zellen von Einfluß.

Die Größe der Zellen in der ersten Untergruppe bewegt sich innerhalb weiter Grenzen; es kommen Arten vor, deren Zellen fast mit Kugelbakterien verwechselt werden können.

Eine sehr auffällige und regelmäßige Erscheinung, die allerdings 10 nicht auf die Torulaceen beschränkt ist, sondern auch bei den Saccharomyceten, wenn auch in geringem Maße, vorkommt, sind die sogen. Riesenzellen (vergl. S. 11). Es sind dies Zellen, deren Dimensionen weit über das durchschnittliche Maß hinausgehen. Diese Riesenzellen, welche auch, soweit die Beobachtungen reichen, regelmäßig in der zweiten 15 Untergruppe der Torulaceen vorkommen, erscheinen häufig sehr hinfällig. Ob sie zu den abnormen Zellformen gehören, oder ob es Zellen mit bestimmten physiologischen Funktionen sind, läßt sich zur Zeit nicht entscheiden.

Viel wechselvoller ist die Form und Größe der Zellen in der zweiten 20 Untergruppe mit gemischter Zellform. Neben solchen Zellen, welche sich nach Form und Größe denjenigen der ersten Untergruppe anreihen, finden sich keulen-, wurst- und mycelfadenförmige in allen Abstufungen. Andere Arten entwickeln sehr dünne und zierliche Zellen. Nicht selten ist die Spindelform, bei welcher die Zellen an den Enden mehr oder weniger 25 zugespitzt erscheinen. Mycelfadenartige Zellen wurden bis zu einer Längenausdehnung von 40 μ bei 2 μ Querdurchmesser beobachtet. Die Ketten langgestreckter Zellen entwickeln häufig an den Enden der einzelnen Glieder sehr zahlreiche rundliche und ovale Zellen (in den Riesenkolonien).

30 Wie schon erwähnt, ist das Auftreten dieser langgestreckten Zellformen teilweise an bestimmte Kulturbedingungen gebunden, so zwar, daß beispielsweise der Organismus innerhalb der Nährflüssigkeit ausschließlich oder vorherrschend mit den gedrungeneren Zellformen wächst, während langgestreckte, ähnlich wie in den Hautvegetationen der 35 Saccharomyceten, erst an der Oberfläche auftreten.

In den Riesenkolonien (vergl. S. 23) mancher Torulaceen besteht dagegen der Oberflächenbelag vorherrschend oder fast ausschließlich aus kugelförmigen oder ovalen Zellen, während auf der Unterseite zahlreiche langgestreckte, wurstförmige Zellen auftreten, die in der Gelatine auf 40 weite Strecken hineinwachsen. Wieder andere Formen entwickeln sich sowohl innerhalb der Nährflüssigkeit wie auf deren Oberfläche gleichzeitig mit gemischten Zellformen.

Die **Zellhaut** zeigt bei den Torulaceen noch größere Mannigfaltigkeit der Erscheinungen als bei den Saccharomyceten. Meist ist sie stark 45 und erreicht bei einzelnen Zellen der typischen Arten eine beträchliche Dicke, die offenbar auch mit einer Schichtung verbunden ist. Noch viel häufiger als bei den Saccharomyceten (s. S. 42) werfen die Zellen eine äußere Hautschichte ab. Möglicherweise stellen diese Zellen mit stark verdickter Haut, die man fast in allen Kulturen findet, Dauerformen 50 (Chlamydosporen) dar. Im Gegensatz hierzu ist die Zellhaut anderer *Torula*-Arten sehr zart. Manchmal, wie bei der von P. LINDNER (6) abgebildeten Art und den Schleimhefen von MEISSNER (1), bildet die Zellwand eine kaum erkennbare Schleimschichte. Bei anderen Arten ist in

den Hautbildungen auf Nährflüssigkeiten deutlich ein gelatinöses Netzwerk (s. S. 43) zu erkennen. Zuweilen verwandeln sich die Kulturen in Nährflüssigkeiten ganz in eine zähe, gallertartige Masse.

Auf eine besondere Beschaffenheit der Zellhaut lassen die knorpelartigen Hautvegetationen auf Nährflüssigkeiten gewisser Arten schließen, 5 in welchen die Zellen dicht beieinander liegen. Solche Arten, welche auf der Oberfläche sehr rasch Häute wie bei *Mycoderma* und *Willia* erzeugen, schließen Luft zwischen den Zellen ein, eine Eigentümlichkeit, welche für eine ähnliche fettige Beschaffenheit der Zellhaut wie bei *Mycoderma* spricht. Ueber die chemische Zusammensetzung der Zellhaut 10 der Torulaceen liegen spezielle Angaben nicht vor.

Der **Zellinhalt** besitzt, von einzelnen Einschlüssen abgesehen, im Gegensatz zu dem der Saccharomyceten und in Uebereinstimmung mit *Mycoderma* in der Regel ein geringes Lichtbrechungsvermögen: er erscheint blaß. Im jugendlichen Zustande der Zelle ist der Inhalt 15 homogen, wird dann später wolkig und schaumig; es treten zahlreiche kleine Vakuolen auf, die später einer einzigen (in kugelförmigen und ovalen Zellen) oder mehreren (in langgestreckten Zellen) weichen. In älteren Zellen wird der Inhalt zuweilen krümlich und zart gekörnt, oder es treten zahlreiche stark lichtbrechende Granula auf. Meist ist jedoch 20 deren Zahl eine beschränkte, und es bilden die stark lichtbrechenden Einschlüsse der Zelle ein sehr charakteristisches Element des Zellinhaltes. Dies trifft insbesondere für die typischen Torulaceen, die Arten der ersten Untergruppe, zu.

In der Regel enthalten die kugelförmigen Zellen ein O e l - 25 k ö r p e r c h e n (s. S. 73), welches von einigen Autoren als Zellkern aufgefaßt worden zu sein scheint. In untergetaucht wachsenden Zellen mit homogenem Inhalt ist es kaum sichtbar und tritt erst mit dem Erscheinen von Vakuolen und deren Größenzunahme insbesondere dann sehr scharf hervor, wenn die Zellen in Hautvegetationen mit der Luft in Berührung 30 kommen. Selbst dann, wenn die Vakuole eine beträchtliche Größe erreicht und das Plasma bis auf einen dünnen Wandbelag reduziert wird, ist das Oelkörperchen noch von einer Plasmaschichte überzogen. In der Regel kugelförmig, erscheint es auch nicht selten platt gedrückt. Die Milchzuckerhefen sind durch die Gegenwart eines Oelkörperchens 35 als zur Gruppe Torula gehörig charakterisiert. RAUM (1) hat ein solches durch Färbung bei der Kefirhefe differenziert, von welcher er schon annimmt, daß sie eine *Torula*-Form im HANSEN'schen Sinne sei. Die Größe der Oelkörperchen nimmt mit dem Alter und bei Berührung der Zelle mit der Luft zu, doch gibt es auch Arten, bei welchen es, soweit 40 die Beobachtungen reichen, klein bleibt. Die Größe der Oelkörperchen kann daher zur Charakterisierung der Arten verwertet werden. Die kugelförmigen und ovalen Zellen einzelner Arten enthalten zwei und mehr Oelkörperchen, welche wahrscheinlich schon vielfach mit Sporen verwechselt wurden. Die langgestreckten Zellen der zweiten Unter- 45 gruppe der Torulaceen enthalten ebenfalls Oelkörperchen, welche in der Zelle in ähnlicher Weise wie in den *Mycoderma*-Zellen verteilt sind, jedoch können sie auch bei Arten mit gemischten Zellformen, bei welchen sie in den rundlichen und ovalen Zellen regelmäßig vorkommen, fehlen.

Ein sehr charakteristischer Einschluß der Torulazellen sind kristall- 50 ähnliche K ö r p e r i n d e n V a k u o l e n; vergl. S. 67. Bei einzelnen Arten regelmäßig vorhanden, scheinen sie bei anderen mit ähnlichen Zellformen zu fehlen; sie würden dann ebenso wie die verschiedene

Anzahl der Oelkörperchen in den kugelförmigen Zellen als diagnostisches Merkmal benutzt werden können.

Sehr alte Zellen der typischen Torulaceen enthalten in ähnlicher Weise wie diejenigen der Saccharomyceten häufig einen sehr großen Tropfen, der teilweise fettartiger Natur ist. Bei den kleinzelligen *Torula*-Arten sind nach LINDNER (4) Fetttröpfchen auch unter normalen Verhältnissen sehr häufig, und es erhält die Zelle zumeist einen starken Lichtglanz mit etwas grünlicher Färbung. *Torula pulcherrima* bildet große, stark lichtbrechende Kugeln.

Glycogen fehlte bei der Kultur in Bierwürze und in neutralem Hefenzuckerwasser mit 6 Proz. Rohrzucker nur wenigen der von mir untersuchten Arten. Auch MEISSNER beobachtete bei einigen seiner Schleimhefen Glycogenbildung. Die Intensität der Reaktion ist sehr verschieden, im allgemeinen jedoch schwach. Bei einer Art mit starkem Gärvermögen war sie am intensivsten. Bei *Sacch. lactis* ADAMETZ und *Sacch. tyrocola* BEIJERINCK findet nach HEINZE und COHN sehr reichliche Glycogenbildung wie bei den Saccharomyceten statt, und zwar besonders auffallend in jungen Kulturen auf schwach saurer Würzegelatine. Die rotbraune Färbung mit Jod tritt bei den Torulaceen entweder im Plasma oder in den Vakuolen auf; in letzteren erstreckt sie sich entweder auf den ganzen Vakuoleninhalt oder auf kugelförmige Einschlüsse von verschiedener Größe.

Ueber den Zellkern liegt nur eine zuverlässige Mitteilung, und zwar von A. GUILLIERMOND (1), vor. Die Angabe für *Sacch. Kefyr* von BEIJERINCK läßt noch Zweifel bestehen, ob nicht eine Verwechselung mit den Oelkörperchen stattgefunden hat. Später sprechen sich sogar Autoren, bei welchen man ein völliges Vertrautsein mit den morphologischen Verhältnissen voraussetzen darf, noch dahin aus, daß deutlich ein Zellkern unterschieden werden kann, wo es sich offenbar nur um das Oelkörperchen handelt.

Sprossung der kugelförmigen Zellen kann an jeder Stelle der Mutterzelle erfolgen. Häufig sprossen sie gleichzeitig an mehreren Stellen aus (Kronenbildung). Die Sproßgenerationen bilden einreihige, unverzweigte Ketten. Im übrigen findet die Sproßfolge wie bei den Saccharomyceten mit verzweigten Sproßverbänden statt. Die Glieder der Sproßverbände hängen wie bei den Saccharomyceten entweder sehr fest zusammen und es entstehen auf diese Weise sehr große Verbände, oder sie lösen sich sehr leicht voneinander ab und es finden sich dann nur 3—4-gliedrige Verbände vor. Saure Nährböden regen manche Milchzuckerhefen zur Bildung ausgedehnterer Sproßverbände, insbesondere bei höherem Säuregrad, an. Einzelne verzweigen sich auch in destilliertem Wasser sehr stark. Die dargebotene Zuckerart hat auf die Sprossung ebenfalls Einfluß. Nicht selten treten Erscheinungen auf, welche nicht mehr den Charakter der Sprossung zeigen, sondern sich demjenigen der Keimung nähern. Die Zelle stülpt sich an einer Stelle mit sehr breiter Basis aus, sie „platzt“ gleichsam. Die hervorwachsende Tochterzelle scheidet sich dann durch eine breite Querwand von der Mutterzelle ab. Abnorme Zellbildung bei der Sprossung ist nicht selten.

Die gestreckten Zellen der zweiten Untergruppe bilden entweder weit ausgebreitete Sproßverbände oder lange, mycelartige Reihen mit sehr geringer seitlicher Verzweigung durch kürzere oder längere Zellen, oder sie erzeugen in großer Zahl kugelförmige Torulazellen.

Die **Riesenkolonien** der zweiten Untergruppe mit langgestreckten

Zellformen sind teilweise von sehr zierlicher Gestalt. Die Oberfläche ist gekröseartig bald gröber bald feiner gefaltet. Diese Faltungen treten jedoch nicht immer bei Gegenwart der langgestreckten Zellformen auf. Die Riesenkolonien weichen also in dieser Beziehung von denjenigen der meisten Saccharomyceten ab; sie gleichen den Kolonien von *Willia* und 5 *Mycoderma*, weichen aber von denjenigen der *Monilia*-Arten ab.

Die Riesenkolonien der ersten Untergruppe hingegen stellen in der Regel mehr oder weniger flache Beläge mit wenig gebuchtetem Rand dar, welche höchstens schwache radiale Streifung und auf der Oberfläche zahlreiche flache oder warzenförmige Erhöhungen zeigen. Diese Erhöhungen 10 sind eine bei den Riesenkolonien dieser Untergruppe ganz allgemeine Erscheinung und nicht bloß der von M. Hartmann (1) aus einer in Java gekauften Trockenhefe gezüchteten *Torula*-Form eigentümlich. Der Speziesname *colliculosa* dieser *Torula* charakterisiert diese Art also keineswegs. Die Zusammensetzung dieser Erhöhungen aus größeren 15 Zellen, wie sie Hartmann angibt, kommt ferner ebenfalls dieser Art nicht allein zu.

Bei manchen Formen erscheint die Oberfläche der Riesenkolonien durch zahlreiche „Zotten" borstig. Die Natur des Nährbodens hat auf die Gestaltung der Riesenkolonien keinen wesentlichen Einfluß. Die Be- 20 schaffenheit und Farbe der Riesenkolonien ist eine sehr verschiedenartige. Häufig tritt eine für die Art charakteristische Färbung, wie schwach rosarot, gelb oder gelbbraun, ebenso wie in den Hautvegetationen auch an den Riesenkolonien überhaupt erst oder mit größerer Intensität hervor, und auch hierdurch gewinnen die Riesenkolonien an diagnostischer 25 Bedeutung. Meist sind die Kolonien farblos. Die Beschaffenheit ist schleimig, gallertartig oder mehr oder weniger trocken, matt oder mattglänzend oder glänzend wie geschliffenes Glas und Perlmutter. Manche Arten erzeugen Riesenkolonien von wachs- und emailleartiger Beschaffenheit. 30

§ 63. Physiologie und Biologie der Torulaceen.

Die Vermehrung in flüssigen Nährböden ist in gleicher Weise wie auf festen von der Zusammensetzung, der Reaktion und der Konzentration, von der Temperatur und anderen äußeren Umständen, insbesondere aber von der Art abhängig. Bei einer größeren Anzahl, 35 welche von mir vergleichend geprüft wurden, war die Entwicklung in neutralem Hefenzuckerwasser mit 6 Proz. Rohrzucker am besten, dann folgten die Kulturen in gehopfter und ungehopfter Bierwürze, ferner die in Hefenzuckerwasser mit einem Zusatz von 0,5 Proz. Pepton. Schon ein geringer Peptonzusatz übt einen großen Einfluß auf die Entwicklung 40 aus, jedoch ist auch das Asparagin eine gute Stickstoffquelle. *Sacch. Kefyr* benützt nach den Untersuchungen von Beijerinck (2) und J. H. Schuurmans-Stekhoven (1) auch die Bernsteinsäure als Nahrung; durch Aethylalkohol wird das Wachstum ebenfalls gefördert. Am wenigsten sagt den Torulaceen die Hayduck'sche Nährlösung zu. Auch 45 in Bier, wenigstens in nicht zu hoher Schichte, war das Wachstum der von mir untersuchten *Torula*-Arten noch ein sehr gutes. Meissner's Schleimhefen gediehen in der Liquide Raulin gut. Weniger günstige Resultate wurden dagegen mit der Nährlösung von E. Laurent erzielt. In Milch entwickelten sich alle meine *Torula*-Arten und riefen dabei 50

teilweise einen käsigen Geruch hervor; in einzelnen Fällen wurde die Milch koaguliert. Von den Milchzuckerhefen, welche sich ebenfalls in diesem Substrat sehr gut entwickeln, veranlaßt nur *Lactomyces inflans caseigrana* Koagulation ohne eine deutliche Säurebildung. Das Coagulum wird teilweise wieder verflüssigt. Einzelne schleimbildende Arten vermehrten sich in allen geprüften Nährlösungen ungemein langsam und zwar zunächst ausschließlich am Boden der Kulturgefäße, während andere Arten aus der gleichen Untergruppe sich sofort an der Oberfläche und sehr rasch in Hautform vermehrten.

Hautbildung tritt früher oder später bei allen bis jetzt von mir untersuchten Arten auf. Manche von ihnen, hauptsächlich aus der ersten Untergruppe, überziehen schon nach 24 Stunden die Nährflüssigkeiten, selbst alkoholische, mit einer Haut, entwickeln sich überhaupt wie *Mycoderma* wesentlich an der Oberfläche. Die Aehnlichkeit mit *Mycoderma*-Arten wird äußerlich um so größer, wenn sich die trockenen, mattgrauen Häute in derselben Weise wie bei diesen mit fortschreitender Entwicklung gekröseartig falten. In einigen Fällen bleibt die Haut glatt und zart. Bei manchen Arten dauert es sehr lange Zeit, bis eine Hautvegetation entsteht; zuweilen kommt es überhaupt nur zu einer Ringbildung (vergl. S. 12) und zwar bei höherer Temperatur. Die Häute sind dann feuchtglänzend, ähnlich denjenigen der Saccharomyceten, zuweilen dickschleimig. Bei stärkerer Entwicklung der Haut kann diese auch eine Färbung (citronengelb, rosarot, lederartig braun, olivengrün) annehmen.

Bei der Entwicklung in der Nährflüssigkeit machen sich sehr verschiedenartige Erscheinungen geltend, welche die Arten gut charakterisieren. Zunächst kann eine Trübung auftreten, die früher oder später unter Bildung von staubigen, flockigen, knäulförmigen, hefigen, festeren oder schleimigen, fadenziehenden Bodensätzen wieder verschwindet oder, wie bei *Sacch. lactis*, von Dauer ist. In anderen Fällen bleibt die Nährflüssigkeit völlig klar. Bei zwei Arten färbte sich Hefenzuckerwasser deutlich citronengelb. Andere Nährflüssigkeiten, wie Bierwürze und Most, werden dagegen entfärbt (vergl. S. 114), und zwar in verschiedenem Grade. Für Bierwürze haben dies L. van den Hulle und H. van Laer (1), Will (1) und P. Lindner (6), für Most R. Meissner (1) festgestellt. Der höchste Entfärbungsgrad, nach der Methode von C. J. Lintner (1) bestimmt, betrug in den Versuchen Will's 0,6. Manche *Torula*-Arten hingegen scheinen Bierwürze sogar dunkler zu färben. Ob dies auch für *Torula Novae Carlsbergiae* von Grönlund (1) zutrifft, mag dahingestellt bleiben, nachdem dieser Forscher die Farbe der Würze nach einer unzulänglichen Methode bestimmt hat.

Die Anpassungsfähigkeit mancher *Torula*-Arten an Nährflüssigkeiten von sehr hoher Konzentration (vergl. S. 118) scheint sehr weit zu gehen. So habe ich die Entwicklung einer Art in Malzextrakt von 76 Proz. unter ziemlich lebhaften Gärungserscheinungen beobachtet. Die Salzhefe Wehmer's blieb in Lösungen mit 24 Proz. Kochsalzgehalt, wie es die benutzte Heringslake war, wochen- und monatelang entwicklungsfähig, während *Lactomyces inflans caseigrana* Bochicchio gesättigten Kochsalzlösungen nur 30—40 Minuten widerstehen konnte. Ein Zusatz von 15 Proz. Kochsalz zur Nährlösung vermochte auf die Entwicklung jener Salzhefe nur verzögernd zu wirken.

Sauere Nährlösungen, für einzelne Arten sogar solche mit hohem Säuregrad, wie beispielsweise Sauerkrautwasser mit fast 1 Proz.

Milchsäure, bieten für die meisten der von mir untersuchten Arten einen ebenso günstigen Nährboden wie neutrale dar. *Lactomyces inflans caseigrana* BOCHICCHIO vegetierte noch in Bouillon mit 1—2 Proz., *Torula amara* HARRISON sogar noch bei 2,4 Proz. Milchsäure; vergl. über letztere Bd. II. S. 197. Einzelne der bis jetzt von anderer Seite beschriebenen, 5 wie die durch E. KAYSER (3) von Ananas abgeschiedene *Torula*, wie *Sacch. lactis* und *Sacch. tyrocola*, erwiesen sich als säureempfindlich. Eine direkte Behandlung mit einer 4-proz. Weinsäurelösung (vergl. S. 137) während 48 Stunden bei 25° C ertrugen alle von WILL (2) untersuchten Arten. 10

Selbst eine alkalische Reaktion sagt einzelnen Arten noch zu. Die MEISSNER'schen Schleimhefen entwickelten sich in alkalisch reagierendem LIEBIG'schem Fleischextrakt mit Zucker ebenso schnell wie in Traubenmost. Die von O. BAIL (1) in verwesenden Rhabarberblättern beobachteten Sproßpilze, von denen wenigstens einige der hier 15 behandelten Gruppe anzugehören scheinen, verschwinden dagegen, wenn die Reaktion der Blattmassen ins Neutrale und Alkalische umschlägt. Eine Reihe der von MAZÉ isolierten lactosevergärenden Sproßpilze rief in alkalischen Nährflüssigkeiten eine weit bessere Gärung als in sauren hervor. Wahrscheinlich werden durch das Alkali bei der Gärung ent- 20 stehende und hemmende Säuren gebunden.

Durch Kohlensäure wurden die Schleimhefen MEISSNER's in der Entwicklung gehemmt, jedoch nicht getötet. Mit steigendem Alkoholgehalt (vergl. S. 129) der Nährflüssigkeit nimmt die Vermehrung dieser Organismen ab. Bei 9 Proz. Alkohol im Most unterblieb sie; die Zellen 25 waren jedoch nicht tot. Die Widerstandsfähigkeit war eine verschiedene. Bei 8,5 Proz. Alkohol in Traubenzuckerbouillon erlitt in den Versuchen von WIRGIN (1) eine *Torula*-Art ebenfalls völlige Hemmung der Vermehrung. Bei Ammoniakzusatz trat eine rapide Vermehrung der Organismen ein. Schweflige Säure übte sowohl auf die Tätigkeit 30 als auch auf die Entwicklung jener Schleimhefen einen Einfluß aus; 0,1 Proz. war etwa als die Grenze für die Entwicklungshemmung zu bezeichnen. Tannin hemmte das Wachstum und die Vermehrung der Schleimhefen, während ihr Widerstand gegen Essigsäure (vergl. S. 137) sehr gering war. 35

Die Temperatur, bei welcher die bis jetzt untersuchten Torulaceen sich noch vermehren, liegt innerhalb weiter Grenzen. Fast alle wachsen noch bei 5—6° C. Die Intensität, mit welcher die Vermehrung erfolgt, ist eine sehr verschiedene. Bei den niedrigen Temperaturen ist sie im allgemeinen eine langsame. Die Art der Nährlösung hat für die Ent- 40 wicklungsfähigkeit bei niederen Temperaturen eine große Bedeutung. Bei einer Temperatur um 0° herum vermochten sich mehrere der von mir untersuchten Arten in Reinhefenbier während eines Monates nicht mehr zu vermehren, während einige in neutralem Hefenzuckerwasser und einige auch in gehopfter Bierwürze, wenn auch nur in geringem 45 Grade, gewachsen waren. Auch bei einer der von HANSEN (9) untersuchten Arten lag das Minimum bei 0,5° C. Der *Sacch. lactis* ADAMETZ, die *Torula* DUCLAUX' und die von E. KAYSER aus Milch isolierte milchzuckervergärende Art passen sich Temperaturen um 0° herum nicht an. Das Temperatur-Optimum bewegte sich bei den von WILL unter- 50 suchten Arten zwischen 20 und 25° C, für die *Torula colliculosa* von HARTMANN dagegen ebenso wie für *Sacch. lactis* ADAMETZ, die *Torula* DUCLAUX' und die milchzuckervergärende Art von KAYSER zwischen

25 und 30° C. Für *Sacch. lactis* Adametz liegt das Optimum für die Gärkraft bei 37.5—40° C. Der *Sacch. tyrocola* bevorzugt jedoch niedrigere Temperaturen von 23—27° C. Das Temperaturoptimum für die Entwicklung und Gärung fällt nicht immer zusammen. Die Wachstumsgrenze war bei *Torula colliculosa* bei 45° C erreicht, während sie Hansen für mehrere seiner *Torula*-Arten bei 36—37° C und für eine bei 38 bis 39° C festgestellt hat, Temperaturen, welche auch für die meisten der von mir untersuchten Arten die Grenze bilden. *Lactomyces inflans caseigrana* Bochicchio wächst bei 40° C sehr rasch; das Wachstum nimmt jedoch bei 45° C ab, und bei 50—60° C stirbt der Pilz nach kurzer Zeit. Für *Torula amara* Harrison liegt das Wachstumsoptimum bei 37° C, die Wachstumsgrenze innerhalb 48 und 50° C. Ebenso wie bei den Saccharomyceten finden sich also auch bei den Torulaceen Arten, welche für die Sprossung merklich verschiedene Grenztemperaturen besitzen, und es können diese ein wertvolles diagnostisches Merkmal abgeben.

Das Wachstum und die Vermehrung ist wesentlich durch den Zutritt von Luft bedingt. Die Torulaceen sind, soweit bekannt, alle sauerstoffbedürftig, und damit steht jedenfalls die vorherrschende Entwicklung vieler Arten auf der Flüssigkeitsoberfläche in ursächlichem Zusammenhang. Das Sauerstoffbedürfnis geht jedoch nicht so weit, daß sie nur bei direkter Berührung mit der Luft leben können: sie gedeihen auch in ziemlich hohen Flüssigkeitsschichten.

Ueber das Verhalten der Torulaceen gegenüber den verschiedenen Zuckerarten liegen zahlreiche Angaben vor, so von E. Chr. Hansen (7), L. van den Hulle und H. van Laer (1), E. Kayser (3), Chr. Grönlund (1), V. Peglion (1), R. Meissner (1), A. Kalanthar (1), O. Bail (1), M. Hartmann (1), L. A. Rogers (1), J. J. van Hest (1), N. Hj. Claussen (1), vor allem aber von P. Lindner (2). Ich selbst habe zahlreiche Gärversuche mit den von mir studierten *Torula*-Arten angestellt. Die von den Autoren angewendete Methode war bei diesen Versuchen eine verschiedene. P. Lindner, M. Hartmann und ich haben sie nach der von ersterem angegebenen Kleingärmethode (s. 18. Kap.) im hohlgeschliffenen Objektträger mit Hefenwasser als Nährflüssigkeit ausgeführt. Jedenfalls spielt die dargebotene Nährlösung bei der Vergärung eine Rolle.

Nur sehr wenigen der bis jetzt bekannt gewordenen Arten, wie der Mehrzahl der Meissner'schen Schleimhefen sowie einigen der von P. Lindner und mir geprüften Torulaformen, geht das Gärvermögen ab. Die Torulaceen sind jedoch, abgesehen von einigen milchzuckervergärenden Arten, keine hervorragenden Alkoholproduzenten. Die meisten vergären Glucose, Mannose, Galactose und Fructose verhältnismäßig leicht; Maltose wird schwierig oder überhaupt nicht vergoren, während die gleichen Arten die anderen genannten Zucker in Alkohol und Kohlensäure zu spalten vermögen, oder die Maltose wird, wie bei *Torula colliculosa*, nur von bestimmten, in den warzenartigen Erhebungen der Riesenkolonien befindlichen Zellen vergoren, während die an den glatten Stellen der Kolonie wachsenden Zellen bei Gegenwart von Maltose nicht die geringsten Gärungserscheinungen zeigen. Rohrzucker wird von sehr vielen Arten und zwar ziemlich lebhaft vergoren, manche vermögen ihn jedoch nicht zu invertieren, vermehren sich aber auf seine Kosten ebenso wie anderer Zuckerarten, welche sie nicht zu vergären vermögen. Milchzucker wird von den meisten Arten nicht in Kohlensäure und Alkohol

gespalten, ebensowenig Trehalose, Melibiose und Melicitose, dagegen von einigen Arten Raffinose. Die *Torula Novae Carlsbergiae* von Grönlund vergärt Dextrin; vergl. Bd. V, S. 210.

Eine kleine Gruppe von Torulaceen, zu welcher die oben angeführten Arten gehören, ist dagegen durch die Eigenschaft, Milchzucker zu vergären, charakterisiert; sie erlangt hierdurch eine hohe praktische Bedeutung. Auch bei dieser Gruppe finden wir, soweit sie in dieser Richtung untersucht ist, die gleichen Erscheinungen wie bei den anderen, daß sie nämlich Glucose, Galactose und Saccharose leicht, die Maltose dagegen schwierig vergärt; vgl. Bd. II, S. 126. *Sacch. pinophthorus melodus* (s. Bd. V, S. 210) von van Hest erzeugt in Bierwürze ein Gas, welches mit blauer Flamme verbrennt.

Die Gärkraft der gleichen Art gegenüber verschiedenen Zuckern erreicht einen verschiedenen Grad. Gleichzeitig mit Hefe ausgesät, vermögen einige wahrscheinlich durch ihre Umsetzungsprodukte diese in der Vergärung zu hindern. Die gebildete Alkoholmenge ist bei einzelnen Arten recht beträchtlich. Dagegen hemmten 10 Proz. Alkohol in der Nährflüssigkeit, wie Heinze festgestellt hat, *Sacch. lactis* Adametz und *Sacch. tyrocola* Beijerinck vollständig in der Entwicklung, ja 5 Proz. genügten schon, um die Vermehrung und Gärung nahezu ganz zu unterdrücken. Auffällig erscheint das von Heinze und Cohn für die beiden letzteren Milchzuckerhefen in Bouillonkulturen mit Lactose gefundene Verhältnis zwischen Alkohol und Kohlensäure, welches ungefähr 3 : 2 betrug. Bei der Gärung tritt auch Esterbildung auf.

Ueber die Enzyme der Torulaceen ist bis jetzt nur wenig bekannt. Invertase scheint bei vielen ausgeschieden zu werden; vergl. Schuurmans-Stekhoven (1) und E. Fischer (1). Den Untersuchungen von H. van Laer (1) zufolge macht sich das Inversionsvermögen erst in gewissen Nährlösungen geltend. Ueber das Vorkommen von Lactase, das von Schuurmans-Stekhoven (1) und von Freudenreich (1) bestritten, von E. Fischer (1) jedoch bestätigt worden ist, vergleiche man Bd. II, S. 127—128. Henneberg (1) stellte bei lebenden Torulazellen die Gegenwart von Katalase fest; sie zersetzten Wasserstoffsuperoxyd.

Gelatine verflüssigen alle bisher geprüften Arten. Die Natur des dabei wirksamen Enzyms ist unbekannt. Der *Lactomyces inflans caseigrana* von Bochicchio erzeugt ein Labenzym und ein tryptisches Enzym; vergl. Bd. II, S. 126. Ein fettspaltendes Enzym scheint von manchen Arten ausgeschieden zu werden. Nahezu alle der bis jetzt von mir untersuchten *Torula*-Arten vermögen bei Gegenwart von Schwefel in der Nährlösung Schwefelwasserstoff, und zwar teilweise in sehr starkem Grade, zu entwickeln; vergl. darüber das 20. Kapitel.

Die Säureerzeugung scheint, soweit hierüber Angaben vorliegen, bei den Torulaceen im allgemeinen geringer zu sein als die Säureverzehrung, wenngleich in einzelnen Fällen, wie bei der Ananas-Torula von Kayser, welche Essigsäure mit geringen Beimengungen von einer höheren Fettsäure bildet, und bei dem *Brettanomyces* von Claussen, die erzeugten Säuremengen ziemlich beträchtlich sind. Die von Weigmann aus fehlerhafter Butter gezüchtete *Torula* produziert in Milch etwa 3,6 Gewichtsprozent Buttersäure. Bei *Sacch. lactis* Adametz und *Sacch. tyrocola* Beijerinck wurden jedoch in den Versuchen von Heinze und Cohn selten mehr als 0,3 Proz. Säure gebildet. Auch die *Torula Novae Carlsbergiae* von Grönlund und der *Sacch. pinophthorus melodus* von van Hest bilden Säure, und zwar war die Säuremenge nach der

Zuckerart verschieden. Die Natur der Säuren ist in diesem Falle nicht bekannt. Bei den von WILL untersuchten Arten nahm dagegen die Acidität der Bierwürze teils zu, teils ab; jedoch war die Abnahme, einen Fall ausgenommen, ebenso wie die Zunahme im allgemeinen nicht bedeutend. In Sauerkrautwasser war die Reaktion selbst bei sehr hoher Acidität durch die Entwicklung einer Art nach einem Monat neutral, bei geringerer Acidität sogar schwach alkalisch geworden. Eine regelmäßige Beziehung zwischen der raschen Hautbildung der Organismen auf der Oberfläche der Nährflüssigkeit zur Abnahme der Acidität konnte nicht festgestellt werden. Die Rhabarberpilze von BAIL verzehrten Citronensäure und Weinsäure.

Die Widerstandsfähigkeit der Torulaceen gegen höhere Temperaturen erreicht bei einzelnen Arten einen ziemlich hohen Grad; sie ist nach der Art, der Einwirkungsdauer und der Zusammensetzung des Substrates, in und auf welchem sie sich befanden, verschieden. Jedenfalls ist dabei auch das Alter und der physiologische Zustand der Zellen von Bedeutung. Sieben der von WILL untersuchten Arten überdauerten nach achttägiger Kultur in Würze noch ein halbstündiges Erhitzen bei 65° C, während die übrigen unter den gleichen Bedingungen schon bei 60° C abgetötet waren. Bei der Mehrzahl der Organismen stimmte die Abtötungstemperatur in Wasser und Würze überein. Noch widerstandsfähiger war eine andere *Torula*, von welcher F. SCHÖNFELD (1) berichtet. Sie starb in Bier selbst bei einstündigem Erhitzen erst bei 68—75° C ab. *Sacch. pinophthorus melodus* von VAN HEST vertrug jedoch nicht ein 5 Minuten langes Erhitzen bei 65° C. Die Widerstandsfähigkeit der MEISSNER'schen Schleimhefen bewegte sich zwischen 54,5 und 61° C; nach zweistündigem Erwärmen bei 45° C waren alle tot. Für die milchzuckervergärenden Torula-Arten liegt die Abtötungstemperatur bei 50 bezw. 55° C. Die verschiedene Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzen gibt also unter Umständen ein brauchbares diagnostisches Merkmal ab.

Auch sehr niedere Temperaturen werden gut ertragen; bei einer solchen von — 22° C während 8 Stunden war eine Tötung der Schleimhefen von MEISSNER nicht erreicht.

Ein Austrocknen scheinen manche Arten sehr gut zu ertragen, wie schon PASTEUR (2) angibt, der seine Torulaformen in den trockenen Zustand überführen konnte, ohne daß sie ihre Entwicklungsfähigkeit verloren. Empfindlicher erwiesen sich dagegen die MEISSNER'schen Schleimhefen, welche beim Austrocknen an der Luft schon am fünften Tage tot waren. Fast ebenso rasch stirbt *Torula amara* von HARRISON in getrocknetem Zustande bei Temperaturen zwischen 15 und 5° C und *Lactomyces inflans caseigrana* von BOCHICCHIO bei 35° C ab.

Die direkte Sonnenbestrahlung hatte keine zerstörende Wirkung auf die MEISSNER'schen Schleimhefen.

In Flüssigkeit ist jedenfalls die Lebensdauer wie bei den Saccharomyceten zum Teil eine sehr lange. HANSEN (8) hat in den in 10-proz. Saccharoselösung aufbewahrten Kulturen selbst nach 16 Jahren noch lebens- und entwicklungsfähige Zellen gefunden; in Bierwürze war bei einzelnen der Tod schon nach weniger als einem Jahr eingetreten, während andere nach acht Jahren noch lebten. Ein sehr hohes Alter besaßen die von J. WORTMANN (1) in über 20 und 30 Jahre alten Weinen (s. S. 133) gefundenen Schleimhefen.

Eine umfassende praktische Bedeutung für den Menschen

scheinen die Torulaceen, soweit bis jetzt bekannt ist, ebensowenig zu haben, wie sie auch im Haushalt der Natur kaum eine hervorragende Rolle spielen dürften. Immerhin kann eine Reihe von Arten sehr unangenehme Erscheinungen und schwere Schädigungen in milchwirtschaftlichen und Gärungsbetrieben verursachen. Sicher harren noch manche Fragen, welche auf die Wirkung von Torulaceen zurückzuführen sind, der Lösung. Einige der von den Medizinern beschriebenen pathogenen Sproßpilze gehören wohl zu den Torulaceen, doch sind sie an dieser Stelle nicht zu berücksichtigen.

Nach den Untersuchungen von Bail (1) ist es sehr wahrscheinlich, daß gewisse Torulaceen eine ursächliche Bedeutung für die Verwesung mancher Pflanzen haben. Das regelmäßige und sehr reichliche Vorkommen von Sproßpilzen, die ebenfalls zu dem hier behandelten Formenkreis gehören dürften, in den ausgeschiedenen Säften konservierter Nahrungsmittel, wie Heringslake (s. 22. Kap. des II. Bds.), in der wässerigen Flüssigkeit des Sauerkrautes (s. 19. Kap. des II. Bds.) und anderer in ähnlicher Weise durch Gärungsprozesse hergestellter Nahrungs- und Genußmittel, brachte die Frage zur Erörterung, ob jene von Belang für die Erzeugung des gewünschten Produktes sind oder nicht; zu einer Entscheidung ist sie bis jetzt nicht gebracht worden.

Eine gewisse Bedeutung können einzelne Arten in den Gärungsbetrieben, insbesondere bei der Bier- und Weinbereitung, dadurch gewinnen, daß sie Krankheitserscheinungen in den Produkten veranlassen, in welchen sie sich zu vermehren und am Leben zu erhalten vermögen. Wesentlich wird im Bier (s. Bd. V, S. 209) der Geschmack beeinflußt. Die Erzeugung aromatischer Produkte mit einem Geschmack und Geruch nach Aepfeln scheint eine Eigentümlichkeit vieler Torulaceen zu sein. Schon öfter wurde die Behauptung ausgesprochen, daß durch die Gegenwart von *Torula* das Bier einen volleren, ja sogar einen pappigen Geschmack erhält. Unter gewissen Bedingungen mag dies wohl zutreffen. In Bierwürze, welche nicht in geschlossenen, vor Luftinfektion gesicherten Apparaten gekühlt und gelüftet wurde, kommen *Torula*-Arten fast regelmäßig vor. Eine stärkere Entwicklung erreichen sie aber nach allen Erfahrungen meist nicht, und zwar in erster Linie deshalb nicht, weil die meisten, wie Will gezeigt hat, bei der Haupt- und Nachgärung entweder unterdrückt werden oder sich höchstens in sehr geringem Umfang zu vermehren vermögen. Die Erfahrung hat gelehrt, daß durch Torulaceen hervorgerufene Krankheitserscheinungen im Bier zu den größten Seltenheiten gehören; sie gelten daher auch im allgemeinen nicht als Bierschädlinge. Nach den Beobachtungen von Will tritt in Kulturen, in welchen sich gewisse schleimbildende *Torula*-Arten entwickeln, nach Zusatz von Hefe sogen. Blasengärung (s. Bd. V, S. 143) auf, bei welcher die Flüssigkeit nicht mit feinblasigem Schaume sondern von wenigen sehr großen Blasen bedeckt ist. Eine hervorragende Rolle spielen nach den übereinstimmenden Mitteilungen von N. Hj. Claussen (1) und H. Seyffert (1) gewisse *Torula*-Arten bei der Herstellung der englischen Biere. Diese als *Brettanomyces* bezeichnete Formengruppe ist für den bei der Nachgärung durch ätherische Stoffe erzeugten Geschmack und Geruch der englischen Biere unerläßlich; vergl. darüber Bd. V, S. 84.

Für die Viehzucht treibenden Gebirgsbewohner des Kaukasus, sowie für die Bewohner Armeniens und die Nomadenvölker des südöstlichen und südlichen Rußlands sind gewisse *Torula*-Arten von hoher wirtschaftlicher Bedeutung. Sie dienen im Verein mit gewissen Bakterienarten

zur Herstellung wichtiger Nahrungs- und Genußmittel, wie Kefir, Kumys, Mazun; Näheres darüber ist im 8. Kapitel des II. Bandes enthalten. *Torula amara* von Harrison verleiht Milch und Käse einen unangenehmen bitteren Geschmack; vergl. Bd. II, S. 197. In Büchsen verpackte Butter 5 wird zufolge L. A. Rogers (2) durch *Torula*-Arten gefährdet; vergl. Bd. II, S. 220.

§ 64. Rote Hefen und schwarze Hefen.

Noch viel weniger als über die in den vorhergehenden Paragraphen dieses Kapitels behandelten, unter gewöhnlichen Verhältnissen farblosen 10 Torulaceen sind wir über jene Sproßpilze unterrichtet, welche sich mit mehr oder weniger intensiver und in den verschiedensten Nuancen abgestufter Rotfärbung dem Auge aufdrängen. Sie werden von den Autoren als „Rosahefe" oder „rote Hefe", in einzelnen Fällen sogar mit dem Gattungsnamen *Saccharomyces* bezeichnet, obgleich die meisten keine Sporen 15 bilden. Anläufe zu einem eingehenderen Studium dieser Sproßpilze sind erst aus neuerer Zeit mit den Untersuchungen von F. A. Janssens und A. Mertens (1) an einer als „rote Torula" benannten Art zu verzeichnen.

Rotfarbige Sproßpilze sind schon sehr lange bekannt. Zuerst wurden solche von Fresenius (1) unter dem Namen *Cryptococcus glutinis* beschrieben. 20 Schröter und Cohn (1) haben diese, von Cohn als Rosahefe bezeichneten und zunächst zu *Cryptococcus glutinis* gestellten Sproßpilze später mit den Saccharomyceten vereinigt. *Cryptococcus glutinis* Fresenius und *Saccharomyces glutinis* sind offenbar zwei verschiedene Arten. Später hat Hansen (4) gezeigt, daß der Name *Cryptococcus glutinis* eine Gruppe von 25 mehreren Arten umfaßt, und daß deren Vereinigung mit den Saccharomyceten unberechtigt ist. Der eine der von Hansen (3 u. 4) selbst untersuchten Sproßpilze ist wahrscheinlich mit dem *Saccharomyces glutinis* Cohn identisch, der zweite ist ein echter Saccharomycet, der dritte ist durch die Bildung von Keimschläuchen charakterisiert und steht dem 30 *Cryptococcus glutinis* Fresenius nahe.

Soweit Hansen (6) und P. Lindner (1) die später von der Koch-schen Schule und den Medizinern überhaupt beschriebenen Rosahefen nachzuuntersuchen Gelegenheit hatten, vermögen diese keine Sporen zu bilden. Nach Lindner ist die Rosahefe von Koch mit der einen von 35 Hansen (2) abgebildeten identisch, da sie die gleichen bizarren Auswüchse wie diese zeigt. Die Sporenbildung fehlt auch Elfving's (1) rotem Sproßpilz.

Rotfarbige Sproßpilze werden erwähnt, zum Teil auch näher beschrieben: Von L. van den Hulle und H. van Laer (1), welche eine 40 Art in Lambic (s. Bd. V, S. 244) fanden. Aus dem Flaschenabsatz eines englischen Bieres stammte auch die rote *Torula* von Janssens und Mertens. Als Fremdling in der Ingwerbierhefe (s. Bd. V, S. 255) führt M. Ward (1) den *Cryptococcus glutinis* an. E. Kramer (1) beschreibt einen roten Sproßpilz, welcher bei der Gärung von Most mitwirkte. 45 Auch V. Peglion (1) und E. Kayser (1) erwähnen eine Rosahefe, welche sie in gärendem Most fanden. R. Demme (1) sieht eine in Käse und in Milch vorkommende Art, die er *Saccharomyces ruber* benennt, als die Ursache von Darmkatarrhen bei Kindern frühesten Alters an. Bemerkt sei, daß A. Kalanthar (1) aus dem kefirähnlichen, aus Büffel- oder 50 Ziegenmilch hergestellten Getränke, dem armenischen Mazun (s. Bd. II,

S. 134), einen orangefarbenen Sproßpilz und eine Art, deren Riesenkolonien anfangs grünlich-grau gefärbt sind und später pfirsichrot werden (s. Bd. II, S. 127), isolierte. In Milch, ebenso wie auch in Butter, scheinen farbige Sproßpilze überhaupt oft vorzukommen. So fand Krueger (1) in käsiger Butter einen Sproßpilz, den er als *Saccharomyces flava lactis* (s. S. 180) bezeichnete, während R. Reinmann (1) in Butter neben anderen Sproßpilzen die Gegenwart von Rosahefe feststellte (vergl. Bd. II, S. 221). A. Lasché (1) hat zwei Arten, *Mycoderma humuli* von Hopfenblättern und *Mycoderma rubrum* von einer infizierten Gelatinekultur, isoliert. Von B. Fischer und K. Brebeck (1) wird eine Rosahefe aus dem Mageninhalt eines an „Magenerweiterung und Magengärung" leidenden Patienten und eine zweite auf hoher See südlich der Azoreninsel San Miguel im Meerwasser gefundene angeführt. Weiterhin erwähnt C. Wehmer (1), daß er in Heringslake auch Rosahefe gefunden habe. Von einigen Arten, wie von der durch A. P. Swan (1) bekannt gewordenen roten Hefe, ist es noch zweifelhaft, ob sie zu der hier behandelten Gruppe gehören; J. Chr. Bay (1) bestreitet deren Saccharomyceten-Natur. Ebenso können noch Zweifel hinsichtlich *Saccharomyces japonicus* und *Saccharomyces keiskeana* (s. S. 131) von K. Yabe (1) geltend gemacht werden. Dagegen soll die eine der von K. Golden und G. Ch. Ferris (1) beschriebenen Arten mit *Saccharomyces glutinis* übereinstimmen; eine andere Art wird zur Gruppe *Mycoderma* gestellt.

Aus allen Angaben über das Vorkommen rotfarbiger Sproßpilze, die sich nicht unschwer vermehren ließen, geht hervor, daß diese Organismen sehr häufig sind.

Dieses bunte Gemisch von Formen, von welchen zum größten Teil eingehendere Untersuchungen fehlen, in ein System zu bringen, ist noch viel weniger möglich als bei den unter dem Gattungsnamen *Torula* zusammengefaßten Arten. Ebensowenig läßt sich entscheiden, ob nicht einzelne der Formen identisch sind.

Nach der besonderen Art der vegetativen Vermehrung kann die eine der von Hansen beschriebenen Arten, ferner *Mycoderma humuli* und *Mycoderma rubrum* von A. Lasché, die rote Torula von Janssens und Mertens, nach den Angaben von P. Lindner auch die Rosahefe von Koch sowie *Blastoderma salmonicolor* von Fischer und Brebeck in einer Gruppe vereinigt werden. Eine zweite würde die Formen mit mehr oder weniger kugelförmigen Zellen umfassen, wie *Saccharomyces glutinis* Cohn, die eine der von Hansen beschriebenen Arten und andere mehr. Letztere könnten als meist farbstoffbildende Arten der ersten Untergruppe der Torulaceen, mit welchen sie, soweit bekannt, vieles gemeinsam haben, vereinigt werden.

Die F a r b e der Zellen ist meist nur dann sichtbar, wenn diese in großer Anzahl beisammen liegen; sie zeigt die verschiedensten Abstufungen: blaßrot, rosarot, zinnober-, korallen-, gelblich-rot und lachsrot. Die Farbstoffbildung scheint bei manchen Arten nur unter bestimmten Verhältnissen einzutreten, bei manchen Arten sehr spät; sie ist also kein konstantes Merkmal. Die Intensität der Färbung wechselt; unter anderem ist sie auch von der Reaktion des Nährbodens abhängig.

Die Form und Größe der Zellen ist ebenso variabel wie bei den Torulaceen.

In den Zellen selbst, insbesondere in denjenigen älterer Kulturen, fallen, wie bei den Torulaceen, stark lichtbrechende Körperchen auf, welche unzweifelhaft wiederholt für Sporen angesehen wurden. Bei der

roten *Torula* von JANSSENS und MERTENS haben die in den Vakuolen befindlichen das Aussehen von Oeltröpfchen und sind orange gefärbt: sie bestehen jedoch zum größten Teil aus Carotin (s. Bd. I, S. 286); Fett scheinen sie dagegen nicht zu enthalten. In älteren Kulturen von *Blastoderma salmonicolor* ist in den Vakuolen öfter ein gleichmäßiger rötlicher Farbenton wahrnehmbar. Im übrigen liegen über den Sitz des Farbstoffes bei den roten Sproßpilzen Angaben nicht vor.

Die Natur des Farbstoffes ist eine verschiedene; teils ist er in Wasser löslich und verschwindet bei der Einwirkung von Säuren und Alkalien. Dagegen gibt bei der roten *Torula* von JANSSENS und MERTENS nur Schwefelkohlenstoff einen klaren, tiefrot gefärbten Auszug.

Nach Angaben von LAURENT (2), sowie von BRAULT und LOEPER (1), erzeugen die roten Sproßpilze auch Glycogen.

Einen kugelförmigen Zellkern mit einem Kernkörperchen beschreiben JANSSENS und MERTENS bei ihrer roten Torula.

Die Sprossung kann sich bei der gleichen Art in verschiedener Weise vollziehen. Einerseits erfolgt sie in analoger Weise wie bei den Saccharomyceten mit der Modifikation wie bei den Torulaceen. RAUM (1) hat beobachtet, daß eine Mutterzelle gleichzeitig bis zu 5 und mehr Tochterzellen trägt. HANSEN (4) hat an einer fixierten Zelle seiner zur zweiten Gruppe gehörigen Art allmählich an derselben Stelle eine ziemlich große Anzahl neuer Zellen entstehen sehen.

Neben diesem Sprossungsmodus findet bei der ersten Gruppe von roten Hefen noch ein Auswachsen der Zellen durch „Keimschläuche“ oder „Promycelien“ statt. In der Regel entstehen seitlich an den ovalen Zellen einfache oder verzweigte, mycelfadenartige Auswüchse, die im Verein mit den Sterigmen der Zelle ein bizarres Aussehen verleihen. Diese „Keimschläuche“ erzeugen durch Sprossung konidienartige, abgerundete oder, wie bei *Blastoderma salmonicolor*, birn-, pflaumen- oder nierenförmige Zellen. Diese Art der Keimung bildet ein sehr charakteristisches Merkmal der ersten Gruppe von roten Sproßpilzen und kommt, soweit bekannt, überhaupt bei keiner anderen Gruppe von Sproßpilzen vor.

Hautbildung findet bei allen Arten von roten Hefen statt, und zwar auf den mannigfaltigsten Nährböden, wie Bierwürze, Bier (ausgenommen *Mycoderma humuli*), Milch, Molken usw. Die Haut ist teils glatt und von schleimiger Beschaffenheit, teils zähe und sehr faltig (bei *Blastoderma salmonicolor*). Im Dunkeln ist bei der roten *Torula* von JANSSENS und MERTENS die Haut viel stärker als im Licht gefärbt, aber weniger widerstandsfähig; die Zellen sind größer. Die im Licht entwickelte Haut stellt dagegen einen wolligen Filz dar, indem sich viele Fäden über die Flüssigkeitsoberfläche erheben. Wahrscheinlich entstehen also Haare oder Zotten wie bei *Monilia candida* und manchen *Torula*-Arten der zweiten Untergruppe und zuweilen auch bei Saccharomyceten. Die Zellen sind in diesem Falle kleiner aber widerstandsfähiger.

Ueber die Riesenkolonien liegen nur wenige Bemerkungen vor, so von P. LINDNER (5) über zwei Arten, bei welchen jene einen schwach mehligen Anflug zeigen; die eine Art unterscheidet sich von der anderen durch Ausbildung von zarten „weißen“ Lufthyphen. Bemerkenswert ist die Entstehung von sekundären Kolonien in Platten- und Strichkulturen, um so mehr, als diese Erscheinung bei zwei Arten auftritt, welche zu der mit Promycelien auskeimenden und konidienähnliche Zellen erzeugenden Gruppe gehören. JANSSENS und MERTENS erklären sich bei ihrer roten *Torula* die Erscheinung in der Weise, daß die Gelatine unter Entwick-

lung eines Gases verflüssigt wird, welches die verflüssigte Gelatine durch die Kolonien hindurchpreßt und über sie hinausschleudert. Gleichzeitig werden aber Zellen mitgerissen. FISCHER und BREBECK glauben dagegen das Auftreten sekundärer Kolonien auf die konidienartigen Zellen zurückführen zu müssen, welche durch leichte Erschütterungen losgelöst werden 5 und sich dann in der Umgebung der ursprünglichen Kolonien ablagern.

Ueber die Ansprüche, welche die rotgefärbten Sproßpilze hinsichtlich der **Ernährung mit organischen Stoffen** machen, liegen besondere Untersuchungen nicht vor, jedoch findet sich die Angabe, daß für gewisse Arten Stärkekleister ein günstiger Nährboden ist. ELFVING's 10 rotgefärbter Sproßpilz vermehrt sich nach den Untersuchungen von HANSEN (6) in rein anorganischen Nährlösungen, und zwar ist eine ziemlich große Lichtintensität erforderlich. Der rote Farbstoff spielt also, wenigstens bei dieser Art, in der Ernährungsphysiologie eine wichtige Rolle, wobei jedoch nicht ausgeschlossen ist, daß sich der Pilz auch 15 saprophytisch ernährt. Die rote *Torula* von JANSSENS und MERTENS wird ebenfalls durch das Licht beeinflußt und verhält sich ähnlich wie chlorophyllführende Pflanzen. Anscheinend atmet sie auch unter dem Einfluß des Lichtes stärker als im Dunkeln. Die Versuche von WENT (1) mit *Monilia sitophila*, bei welcher das Carotin erst unter dem Einfluß des Lichtes 20 entsteht, deuten darauf hin, daß die reichliche Carotinbildung die **Enzyme** des Pilzes gegen das intensive Licht schützt. Ueber letztere ist bei den rotgefärbten Sproßpilzen wenig bekannt. HENNEBERG (1) stellte Katalasewirkung fest. Gärvermögen ist dagegen, wenigstens bei den mycodermaähnlichen roten Sproßpilzen der zweiten Gruppe, nicht vor- 25 handen und scheint auch bei denjenigen der ersten Gruppe nur wenig ausgebildet zu sein. Der rotfarbige Sproßpilz von E. KRAMER vergärt Dextrose, Maltose und Saccharose, welche zuvor invertiert wird, Lactose dagegen nicht. Nach achttägiger Gärung in Zuckerlösung waren 4,5 Vol.-Proz. Alkohol gebildet, wobei die Lösung einen angenehmen obstartigen 30 Geruch angenommen hatte, also Ester gebildet worden waren. In sauerer Lösung ging die Vergärung lebhafter vonstatten als in alkalischer; selbst 1,5 Proz. Weinsäure wirkten eher begünstigend als hemmend. LINDNER (2) hat mit roten Hefen in keinem Falle Gärung erhalten. Die grünliche Mazunhefe von KALANTHAR (s. S. 297) hat jedoch Gärvermögen. 35

Ueber das **Verhalten der roten Sproßpilze gegenüber Säuren** liegt kaum eine Angabe vor. Von der roten *Torula* von JANSSENS und MERTENS wird nur wenig und zwar nur nicht-flüchtige Säure erzeugt.

Das **Temperaturoptimum für das Wachstum** liegt, wie bei vielen *Torula*-Arten, um 20° C herum. Bei der roten *Torula* von 40 JANSSENS und MERTENS ist die Lebensfähigkeit bei 30° C schon vermindert. Eine von SCHMIDT-NIELSEN (1) von der Oberfläche der Tiefwassergarnele (*Pandalus borealis*) isolierte rote *Torula* bildete auf Kartoffelscheiben bei 0° in 50—60 Tagen eine üppige Kultur. Die Rosahefe von E. KAYSER leistet dem Erhitzen in feuchtem Zustande bei 45° C 45 Widerstand.

Soweit wir bis jetzt über die roten Sproßpilze unterrichtet sind, scheint ihnen, abgesehen von dem einen von DEMME angeführten Fall (s. S. 296), im allgemeinen eine hervorragende praktische Bedeutung nicht zuzukommen. Gleichwohl vermögen sie zuweilen recht unangenehme 50 Erscheinungen hervorzurufen. Infolge einer sehr starken, offenbar durch besondere Umstände begünstigten Vermehrung hatten nach einer Mitteilung von WILL (3) rote Sproßpilze Grünmalz im ganzen Althaufen

rot gefärbt. Beim Trocknen nahm das Grünmalz eine schmutzig-braune Farbe an, das Darrmalz wurde mißfarbig, unansehnlich. Die Infektion des Malzes konnte auf das Weichwasser zurückgeführt werden; vergl. Bd. V, S. 164. Bierwürze wird zwar von der Rosahefe, welche L. VAN DEN HULLE und H. VAN LAER in Lambic gefunden haben, sowie von der roten *Torula* von JANSSENS und MERTENS etwas entfärbt, ebenso erteilt auch erstere der Würze einen säuerlichen Geschmack. Für den Brauereibetrieb dürften diese Eigenschaften jedoch kaum in Betracht kommen, da die roten Sproßpilze ebenso wie die *Torula*-Arten jedenfalls von der lebhaft sich vermehrenden und gärenden Bierhefe unterdrückt werden, und, wenn sie die Gärung überdauern sollten, der Entfärbungsgrad der Würze, welcher durch die Bierhefe selbst bedingt ist, kaum durch die roten Sproßpilze wesentlich erhöht werden dürfte.

Auch über **schwarze Hefen** liegen bisher schon einige Angaben vor. Der von G. MARPMANN (1) als *Saccharomyces niger* benannte und aus Milch isolierte Pilz bildet runde bis ovale Zellen, 1.5—3 μ groß, welche sich durch Sprossung vermehren. In Zuckernährlösungen wächst er nicht zu Mycelfäden aus. Auf Gelatine bildet er sammetschwarze Rasen, in Nährlösungen schwarze Bodensätze. Rohrzucker und Milchzucker werden nicht vergoren, dagegen Traubenzucker in sehr geringem Grade. Der Pilz enthält nach den Angaben von B. H. BUXTON (1) weder Diastase noch Maltase, Invertase, Lactase und Inulase. HANSEN (6) hat nachgewiesen, daß der *Saccharomyces niger* keine Sporen bildet, also kein echter Saccharomycet ist. Die dunkel gefärbten Sproßpilze überhaupt gehören nach HANSEN zwar verschiedenen Arten an, stimmen aber alle darin überein, daß ihnen die Sporenbildung abgeht und daß sie keine Gärung hervorrufen. Sie sind wahrscheinlich, nach der Meinung dieses Autors, Sproßformen von *Cladosporium*- oder *Fumago*-Arten. P. LINDNER (1) unterstützt diese Anschauung durch die Mitteilung, daß die im KOCH'schen Laboratorium gezüchtete schwarze Hefe in jüngeren Kulturen zwar ein aus Sproßzellen bestehendes Polster bildet, jedoch später zu einem aus Hyphen bestehenden dunkelgrünen Rasen auswächst. Offenbar ist die schwarze Hefe von MARPMANN von der KOCH'schen verschieden. *Torula nigra* von GUILLIERMOND (2) vegetiert üppig auf Carotten. Deren Oberfläche ist 24 Stunden nach der Aussaat von einer klebrigen, schwarzgrünen Masse überzogen, welche ausschließlich aus ovalen und leicht verlängerten Sproßzellen zusammengesetzt ist. Diese werden durch einen Schleim zusammengehalten, in welchem sich einige schwärzliche, festere Partikelchen befinden. Nach einigen Tagen entsteht auf den weniger feuchten Teilen des Nährbodens ein sehr dünnes Mycel, welches aus der schwarzen Hefenmasse hervorkommt und sich in Form eines grauen Filzes abhebt. Nach der Anschauung von GUILLIERMOND gliedert sich dieser Pilz wahrscheinlich an *Dematium* an. P. LINDNER (5) erwähnt eine von ZEIDLER isolierte schwarze Hefe mit ellipsoidischen Zellen von 0,6 μ Längsdurchmesser. Auf Würzegelatine wächst sie mit feuchter, gekröseartig gefalteter Oberfläche, auf der sich eine spärliche Wolle entwickelt. Schwarze Hefen kommen nach HANSEN im Staub der Luft nicht selten vor, jedoch scheint keine von ihnen eine besondere praktische Bedeutung zu haben. Die Ursache der „schwarzen Käse“ ist nach G. GROTENFELT (1) schwarze Hefe; vergl. Bd. II, S. 232.

Literatur

zum Kapitel Torulaceen, Rosahefen und schwarze Hefen.

*Adametz, L., (1) Centralbl. f. Bakt., 1889, Bd. 5, S. 110. — (2) Ueber die Ursachen und Erreger abnormaler Reifungsvorgänge beim Käse. Bremen 1893. *Bail, O., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 567. *Bay, J. Christian, (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1896, Bd. 2, S. 259. *Beijerinck, M. W., (1) Centralbl. f. Bakt., 1889, Bd. 6, S. 44. — (2) Archives néerland. des sciences exactes et nat., Bd. 23, S. 428; ref. in Bot. Centralbl., 1892, Bd. 51, S. 44. — (3) Ebenda, S. 42; Bot. Centralbl., 1892, Bd. 51, S. 384. *Bochicchio, Nicola, (1) Centralbl. f. Bakt., 1894, Bd. 11, S. 546. *Boersch, Karl, (1) Beitrag z. Kenntnis d. Bakterien d. Weins u. z. Kenntnis d. Hefen. Dissert., Erlangen 1893. *Brault, A., und Loeper, M., (1) Journ. de Physiol. et de Pathol. générale, 1904, Bd. 6, S. 720. *Buxton, B. H., (1) American Medicine, 1903, Bd. 5, S. 137; ref. in W. f. Brauerei, 1904, Bd. 21, S. 722. *Claussen, N. Hjelte, (1) W. f. Brauerei, 1904, Bd. 21, S. 370. *Demme, R., (1) Centralbl. f. Bakt., 1890, Bd. 9, S. 271. *Duclaux, Emile Pierre, (1) Ann. Pasteur, 1887, Bd. 1, S. 573; 1889, Bd. 3, S. 201. *Elfving, (1) Oefversigt af Finska Vetensk. Soc. Förh., Bd. 28. *Engler, A., und Prantl, K., (1) Die natürl. Pflanzenfamilien, 1900, I. Teil, 1. Abt.**, Lief. 196 u. 197, S. 454. *Fischer, Bernhard, und Brebeck, Karl, (1) Zur Morphologie, Biologie u. Systematik d. Kahmpilze, d. Monilia candida Hansen u. d. Soorpilzes. Jena 1894. *Fischer, Emil, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1894, Bd. 27, S. 3481. *Fresenius, (1) Beiträge zur Mykologie. 1850—1863. *Freudenreich, Eduard von, (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1897, Bd. 3, S. 47. *Golden, Kathr., und Ferris, G. Charles, (1) The Botanic. Gaz., 1898, Bd. 25, S. 39; ref. in Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 647. *Grönlund, Chr., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1892, Bd. 15, S. 281. *Grotenfelt, G., (1) Fortschritte der Medizin, 1889, Bd. 7, S. 121. — (2) Milchztg., 1891, S. 759. *Guilliermond, A., (1) Recherches cytologiques s. les levures et quelques moisissures à formes levures. Lyon 1902, S. 203. — (2) Ebenda, S. 211. *Hansen, Emil Chr., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1878 u. 1882, Bd. 1, S. 49 u. 197. — (2) Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, 1879, Bd. 1, Tafel II, Fig. 1—34. — (3) Comptes rendus de Carlsberg, 1879, Bd. 1, S. 72. — (4) Ebenda, 1879, Bd. 1, S. 81. — (5) Ebenda, 1882, Bd. 1, S. 47. — (6) Allgem. Brauer- u. Hopfen-Ztg., 1887, Bd. 17, S. 1109. — (7) Comptes rendus de Carlsberg, 1888, Bd. 2, S. 143. — (8) Ebenda, 1898, Bd. 4, S. 93. — (9) Ebenda, 1902, Bd. 5, S. 92. — (10) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1905, Bd. 14, S. 545. *Harrison, F. C., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 9, S. 206. *Hartmann, M., (1) W. f. Brauerei, 1903, Bd. 20, S. 113. *Heinze, Berthold, (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 553, Anmerkung, und Z. f. Hyg., 1904, Bd. 46, S. 296. *Heinze, Berthold, und Cohn, E., (1) Z. f. Hyg., 1904, Bd. 46, S. 286. *Henneberg, W., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1904, Bd. 27, S. 96. *van Hest, J. J., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1903, Bd. 26, S. 808. *van den Hulle, L., und van Laer, Henri, (1) Mémoires cour. etc. par l'Acad. roy. etc. de Belgique, 1890; ref. in W. f. Brauerei, 1891, Bd. 8, S. 954. *Janssens, F. A., und Mertens, Ad., (1) La Cellule, 1903, Bd. 20, S. 351. *Jensen, Orla, (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 11. *Kalanthar, Anusch, (1) Z. f. physiolog. Chem., 1898, Bd. 26, S. 88. *Kayser, E., (1) Le Cidre, 1890, Bd. 3, S. 371. — (2) Ann. Pasteur, 1891, Bd. 5, S. 395. — (3) Ebenda, S. 456. *Klein, E., und Gordon, Mervyn, (1) Centralbl. f. Bakt., 1. Abt., 1903, Bd. 35, Orig., S. 138. *Kossowicz, A., (1) Z. f. d. landw. Versuchsw. in Oesterreich, 1902, Bd. 6, S. 27. *Kramer, Ed., (1) Oesterr. landw. Centralbl., 1891, Bd. 1, S. 30; ref. in Chem. Centralbl., 1891, Bd. II, S. 707. *Krueger, R., (1) Molkereizeitung, Hildesheim, 1892, Nr. 34—38. *van Laer, Henri, (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1905, Bd. 14, S. 550. *Lasché, A., (1) Der Braumeister, Chicago, 1892, Nr. 9. *Laurent, Emile, (1) Ann. Pasteur, 1888, Bd. 2, S. 113; Bot. Centralbl., 1889, Bd. 39, S. 120. — (2) Ann. Soc. belge de microscop., 1890, Bd. 24, S. 54. *Lindner, Paul, (1) W. f. Brauerei, 1887, Bd. 4, S. 853. — (2) Ebenda, 1900, Bd. 17, S. 713 u. f. — (3) Mikroskop. Betriebskontrolle etc., 4. Aufl., Berlin 1905, S. 421. — (4) Ebenda, S. 424. — (5) Ebenda, S. 427 u. f. — (6) Ebenda, S. 422. *Lintner, C. J., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1892, Bd. 15, S. 213. *Ludwig, F., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1896, Bd. 2, S. 337. *Marpmann, G., (1) Centralbl. f. allgem. Gesundheitspflege, 1886, S. 422. *Mazé, P., (1) Ann. Pasteur, 1903, Bd. 17, S. 11. *Meissner, Richard, (1) Landw. Jahrbücher, 1898, S. 715. *Mix, L. Ch., (1) Proceed. American Acad. of Arts and Sciences, 1891, Bd. 26, S. 102. *Pasteur, L., (1) Études s. la bière. Paris 1876, S. 73, Anm. 1. — (2) Ebenda, S. 76. *Peglion, Vittorio, (1) Staz. speriment. agrar. ital., 1895, Bd. 28, S. 369; ref. in Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1895, Bd. 1, S. 862. *Pirotta und Riboni, (1) Rendiconti d. R. Istituto Lombardo, 1879. *Raum, J., (1) Z. f. Hyg., 1891, Bd. 10, S. 17. *Reinmann, R., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1900, Bd. 6, S. 131. *Rogers, L. A., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1903, Bd. 10, S. 381. — (2) Ebenda, 1904, Bd. 12, S. 338. *Schander, R., (1) Jahresber. d. Vereinigung d. Ver-

treter d. angew. Botanik, 2. Jahrg., 1903/04, S. 104. ***Schmidt-Nielsen,** S., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 9, S. 145. ***Schönfeld,** F., (1) W. f. Brauerei, 1898, Bd. 15, S. 288. ***Schröter** und **Cohn,** (1) Beitr. z. Biol. d. Pflanz., 1872, Bd. 1, S. 110 u. 187, Taf. III, Fig. 1. ***Schuurmans-Stekhoven,** J. H., (1) Dissert., Utrecht 1891, und Onderzoekingen, gedonn in het Physiolog. Laborat. der Utrechtschen Hoogschol. Uitgeg. d. Th. W. Engelmann en C. A. Pekelharing. Vierte Reeks. I. 2., Utrecht, S. 119. ***Seyffert,** H., (1) W. f. Brauerei, 1904, Bd. 21, S. 519. ***Swan,** Allan P., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1896, Bd. 2, S. 1. ***Ward,** Marshall, (1) The Brewer's Guardian: ref. in W. f. Brauerei, 1892, Bd. 19, S. 75. ***Wehmer,** C., (1) Abhandlungen d. deutschen Seefischereivereins, 1898, Bd. 3, S. 1. — (2) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1905, Bd. 14, S. 682. ***Weigmann,** H., (1) Milchztg., 1890, Bd. 19, S. 743. ***Went,** F. A. F. C., (1) Recueil des travaux bot. Néerland., 1904, Nr. 1; ref. in W. f. Brauerei, 1904, Bd. 21, S. 698. ***Will,** H., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1903, Bd. 26, S. 283. — (2) Ebenda, S. 284. — (3) Ebenda, 1905, Bd. 28, S. 128. ***Winkler,** W., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 721. ***Wirgin,** G., (1) Z. f. Hyg., 1902, Bd. 40, S. 307. ***Wortmann,** J., (1) Vorkommen u. Wirkung lebender Organismen in fertigen Weinen u. ihre Bedeutung f. d. Weinbereitung. Berlin, 1890. ***Yabe,** K., (1) Imp. University College of Agricult. Tokyo, Bull. Nr. 3, S. 232; ref. in Chem. Centralbl., 1897, Bd. II, S. 818.

(Manuskript-Einlauf: 15. Juli 1906.)

14. Kapitel.

Die Mycodermen.

Von Prof. Dr. Richard Meissner.
Vorstand der Kgl. Württ. Weinbau-Versuchsanstalt in Weinsberg.

§ 65. Arten der Mycodermen.

Zu den Kahmhefen (vergl. S. 15 u. 281) gehören zahlreiche Arten, von denen bislang verhältnismäßig nur wenige einem genauen Studium unterworfen worden sind. Alle Arten sind einzellige Sproß-pilze, die sich entweder durch Sprossung und Sporenbildung oder durch Sprossung allein vermehren. Die Kahmhefen sind also zum Teil echte Saccharomyceten aus den Gattungen *Pichia* und *Willia* (s. S. 184 u. 186), zum Teil Nicht-Saccharomyceten. Die letzteren kann man wieder in drei Gruppen teilen: zwei von diesen gehören zu den Torulaceen (s. S. 282), die dritte Gruppe bilden die typischen *Mycoderma*-Arten. Nur die zuletzt genannten Arten sind Gegenstand des vorliegenden Kapitels. Bei dieser Einteilung werden also auch solche Pilzarten, die von früheren Forschern zwar als *Mycoderma* bezeichnet, aber auf Grund, sei es ihres Gärvermögens, sei es ihrer ovalen Zellgestalt u. a. m. zu den Torulaceen oder zu den Rosahefen gerechnet werden müssen, von der Betrachtung in diesem Kapitel ausgeschlossen bleiben; also z. B. Heinze's *Mycoderma cucumerina* Aderhold, die von Lasché als solche aufgeführten *Mycoderma*-Arten, ebenso *Myc. rubrum*, *Myc. humuli* Lasché's, die zwei als *Mycoderma* bezeichneten Arten Henneberg's, ebenso die sporenbildenden Kahmhefen Fischer's und Brebeck's. Im Voraus sei gleich bemerkt, daß die Torulaceen und die Mycodermen zahlreiche gemeinsame Eigenschaften besitzen; über die Unterscheidungsmerkmale vergl. man S. 282.

Zu den *Mycoderma*-Arten gehören u. a.: Eine Kahmhefenart, die von Will (1) eingehend untersucht worden ist, Kahmhefenarten, die Meissner (1) beschrieben hat, ferner Arten, welche von Hansen, A. Petersen,

Grönlund, Jörgensen, Lindner, Prior, Bèlohoubek, Kukla, Forti, Seifert, Lafar, Koch, Wortmann, Ed. Rist und J. Khoury (vergl. Bd. II, S. 136) u. a. beschrieben worden sind. Diese verschiedenen Mycodermaarten haben wie die echten Weinhefen in dem Erdboden ihren natürlichen Aufenthaltsort. Sie gelangen von dort durch die Insekten, den Regen oder den Wind, wie die Untersuchungen Hansen's, Müller-Thurgau's und Wortmann's gezeigt haben, in die ihnen zusagenden Nährlösungen.

Noch bis zum Jahre 1871 findet sich bei Trécul die Ansicht, daß eiweißartige Materie sich in Bakterien oder direkt in Bierhefe, diese in *Mycoderma*, letztere wiederum in *Penicillium* verwandelt (vergl. S. 143). Gleichen Gedanken begegnet man in einer Arbeit Hoffmann's (1) aus dem Jahre 1869. In demselben Jahre erschien aber eine Abhandlung von Adolf Mayer (1), in welcher sich letzterer gegen den genetischen Zusammenhang von Hefe und *Mycoderma*, sowie von Hefe und *Penicillium* wandte. Auch Reess (1) trat im Jahre 1870 der Identifizierung von *Penicillium*, Weinhefe und *Mycoderma* entgegen.

Daß aber der sogen. *Sacch. Mycoderma* (s. S. 169) und *Mycoderma vini* und *Myc. cerevisiae* nicht, wie man früher annahm, nur aus einer einzigen Spezies besteht, ist durch die mannigfachen Untersuchungen neuerer Forscher erwiesen worden. Die Wege, welche zu dieser Erkenntnis geführt haben, sind dieselben, auf welchen Hansen zu der Aufstellung verschiedener Bierhefenrassen gelangte. Es sind dies die Reinzüchtung dieser Organismen und deren genaue morphologische und physiologische Untersuchung.

Ausgangsmaterial verschiedener Mycodermarassen zur Reinzüchtung zu erlangen, bereitet keine Schwierigkeiten: man gießt aus Flaschen, welche alkoholarme Weine, Obstweine, Bier usw. enthalten, die Hälfte des Inhaltes ab, schüttelt den Rest ein paarmal tüchtig um, verschließt die Flaschen mit Wattestopfen und läßt sie bei etwa 20° C einige Tage hindurch stehen. Durch diese Behandlung ist genügend Sauerstoff in die Flaschen und in die Flüssigkeiten gekommen, und infolgedessen werden sich auch die in letzteren enthaltenen Mycodermen eventuell neben anderen Organismen gut entwickeln. Ueber ein anderes Verfahren der Gewinnung von Mycodermenmaterial aus einer Hefenprobe vergleiche man Bd. V, S. 167. Die Reinzüchtung dieser Organismen geschieht nach der von Hansen angegebenen Methode (s. S. 107 u. f.).

Die verschiedenen Mycodermarassen unterscheiden sich durch die Gestalt und Größe ihrer Zellen, deren Vermehrungsgeschwindigkeit, ihr Wachstum in Riesen-, Stich- und Strichkulturen, durch die Art der Deckenbildung und der damit verbundenen Begleiterscheinungen. Endlich ergeben auch die physiologischen Untersuchungen zwischen den einzelnen Mycodermen Unterschiede, die gleichfalls auf Rassenverschiedenheiten hindeuten.

§ 66. Gestalt, Größe und Inhaltskörper der Mycodermazellen.

Auf Grund einer bloßen mikroskopischen Untersuchung die Frage zu entscheiden, ob in einem gegebenen Falle verschiedene Mycodermarassen vorliegen oder nur eine einzige, bereitet genau dieselben Schwierigkeiten wie die mikroskopische Unterscheidung der einzelnen Bier- oder Weinhefenrassen in einem Gemenge. Bei den Mycodermen kommt noch

als erschwerendes Moment hinzu, daß sie während ihrer Entwicklung in Most oder anderen Nährböden vielen Gestaltsveränderungen unterworfen sind, während z. B. die echten Weinhefen bei ihrer Entwicklung in Most im großen und ganzen konstante Formen beibehalten. Die Mycodermen dagegen variieren, namentlich in der Jugend, unter Umständen so stark in der Gestalt, daß man versucht wäre, an eine Verunreinigung der Kultur zu denken, wenn man sich nicht durch kontinuierliche Beobachtung der Entwicklung einzelner Zellen zu Sproßverbänden von der Variabilität der Zellformen überzeugt hätte.

Diese Erscheinung ist zu verschiedenen Zeiten von verschiedenen Forschern beobachtet worden. Winogradsky (1) schreibt diese Formveränderung nicht nur dem spezifischen Nährmedium zu, vielmehr hängt sie nach ihm vor allem auch von dem Mangel oder Reichtum an Sauerstoff, bei dem die Mycodermen wachsen, ab. Ein und dieselbe Art wächst bei Sauerstoffzutritt hefenzellähnlich, und bei Sauerstoffmangel erlangt sie mycelialen Charakter. Auch Will (1) hat gefunden, daß die Form der von ihm untersuchten *Mycoderma*-Art im einzelnen innerhalb weiter Grenzen wechselt, aber nicht nur die Form, sondern auch die Größe und der Inhalt der Zellen. Zu dem gleichen Resultat kam auch Meissner (1). Unter den von ihm morphologisch untersuchten Rassen waren die größeren Zellen 4,6 μ breit und 19,2 μ lang. Die Breite und Länge der Zellen der übrigen Rassen hielten sich unterhalb dieser Grenzen. Nach Will (1) sind die typischen Mycodermazellen 8—11 μ (durchschnittlich 9 μ) lang und 5 μ breit.

Die Gestalt der Zellen ist die pastoriane, an den Ecken abgerundete (s. *Fig. 84* u. *85*). Mitunter findet man ganz unregelmäßige, halbmondförmige, birnenförmige Zellen (s. *Fig. 86*), worauf auch P. Lindner (1)

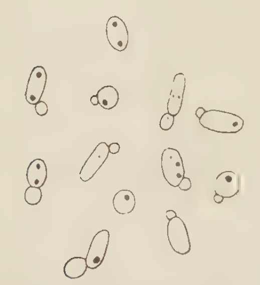


Fig. 84. Mycoderma aus Rotwein von Eltville. Pastoriane und runde Formen der Zellen. Vergr. 600.



Fig. 85. Mycoderma aus westpreußischem Heidelbeerwein. Pastoriane Form der Zellen. — Vergr. 600.



Fig. 86. Mycoderma aus Rüdesheimer Wein. Unregelmäßige Zellformen. Vergr. 600.

aufmerksam gemacht hat. Will (1) gibt genaue Mitteilungen über die Zellhaut und den Zellinhalt der Mycodermazellen. Die Zellhaut erscheint nach diesem Forscher bei jüngeren Mycodermazellen nach Kontraktion des Zellinhaltes mittels Glycerin nur schwach lichtbrechend. Die Membran ist meist nicht so dick wie diejenige von Hefenzellen. Auch bei den in älteren Kulturen regelmäßig auftretenden schlankeren Zellen ist die Haut blaß und scheint es auch immer zu bleiben. Dagegen unterscheiden sich nach Will (1) die in älteren Kulturen auftretenden derberen Zellen von kurz-ovaler und fast rundlicher Form

durch ihre starke, von einer breiten Kontur umgrenzte Membran von den übrigen Zellen. Auf Zusatz von einproz. Osmiumsäure färbte sich nach WILL die Zellhaut schwarzbraun, eine Erscheinung, die von MEISSNER (1) bei den Wein-Mycodermen nicht beobachtet werden konnte. Dieses Verhalten der Membran der Mycodermazellen führt WILL zu dem Schluß, daß in bezw. auf ihr Substanzen abgelagert sind, welche sich wie Fette oder Oele verhalten. WILL (2) machte auch darauf aufmerksam, daß beim mikroskopischen Betrachten der Mycodermazellen solche gefunden werden, die sich durch einen gewissen Glanz und gleichzeitig durch einen bläulichen Schimmer auszeichnen. Diese Zellen erhalten nach WILL, wie auch MEISSNER (1) bestätigen konnte, die angegebene Eigenschaft in erster Linie dadurch, daß sie von einer Lufthülle umgeben sind. Der stärkere Glanz der Zellen kann außerdem mit durch den Glycogengehalt bedingt sein, der in den einzelnen Zellen ein und derselben Zucht sehr verschieden groß sein kann. Der Zellinhalt junger Mycodermazellen besitzt, ebenso wie derjenige der Torulaceen, ein geringes Lichtbrechungsvermögen (s. S. 287) und besteht nach WILL (1) aus wenig fester, mit Jod färbbarer Substanz. Der Inhalt muß also sehr wasserhaltig sein. Die Vakuolen, welche zu dreien, vieren und mehreren anfänglich in einer Zelle vorhanden sind, verschmelzen später zu einer oder zweien. Stark lichtbrechende Körperchen („Oelkörperchen") sind in sehr jungen Zellen noch nicht sichtbar. Setzt man Jod zu solchen Zellen, so kommen an denjenigen Stellen, an welchen in den älteren stark lichtbrechende Körperchen liegen, stärker gefärbte dichtere Körnchen zum Vorschein. Nach 48 Stunden sind diese auch ohne Reagens schon sichtbar. Am dritten Tag sind sie in der Ein- bis Dreizahl vorhanden und lagern entweder an den Enden der Zelle, oder eines erscheint am Ende, das andere zwischen zwei Vakuolen seitlich oder in der Mitte. Dabei sind die Vakuolen deutlicher sichtbar geworden und von einer dichteren Plasmahaut umgeben. Nach 48 Stunden tritt in den Zellen mit Jod schwache Glycogenreaktion ein. Nach und nach, wenn die Zellen alt geworden sind, findet man in den Vakuolen Kristalloide, die Oelkörperchen bilden sich und erreichen eine bedeutende Größe (2 μ Durchmesser). Letztere färben sich mit Osmiumsäure schwarzbraun. Im Gegensatz zu den Oelkörperchen alter Hefenzellen färben sich nach WILL diejenigen der Mycodermazellen mit konzentrierter Schwefelsäure nicht; das Oel wird wie dort aus den Zellen bei Zusatz der Säure entleert. Weitere Angaben darüber wie auch über Lage, Bau und Teilungsmodus des Zellkernes findet man im 2. Kapitel.

§ 67. Die Vermehrung der Mycodermen in und auf verschiedenen Nährböden.

Wie bereits auf S. 302 hervorgehoben wurde, vermehren sich alle Mycodermen durch Sprossung, welcher Vorgang im allgemeinen bereits auf S. 171—175 des Ersten Bandes erörtert worden ist. An dieser Stelle hier sei nur kurz die für die pastorian geformten Mycodermazellen charakteristische Entstehung eines Sproßverbandes beschrieben, der sich unschwer von demjenigen einer typischen oval gestalteten Hefenzelle unterscheidet.

Säet man eine pastorian gestaltete Mycodermazelle in eine Nährlösung, z. B. in Würze oder Traubensaft, ein und beobachtet man die

Entwicklung der Zelle mikroskopisch, so sieht man, daß sie an einem ihrer Enden genau so sproßt wie echte Hefe (s. *Fig. 87, a*). Sobald die Tochterzelle 2 fertig gebildet ist, sproßt sie (*b*) in der Richtung der Längsachse weiter, während die Mutterzelle seitlich von der Stelle, an der sie vorher die Tochterzelle 2 sprossen ließ, eine neue Tochterzelle 3 anlegt. Nachdem diese neu angelegten Tochterzellen ausgewachsen sind, sprossen sie (*c*) in der Richtung ihrer Längsachsen weiter, während die früheren Mutterzellen wieder seitlich sprossen (*d*). Der Sproßverband sieht schließlich, um ein Bild zu gebrauchen, etwa so aus, wie eine Tanne, bei der der Mitteltrieb und die angelegten Seitentriebe in der einmal eingenommenen Längsrichtung weiterwachsen, sich aber von Jahr zu Jahr regelmäßig verzweigen. Die Verzweigungen des Mycodermen-Sproßverbandes finden in guter Nährlösung und bei günstiger Temperatur etwa nach je 2 Stunden statt. Da in Würze oder Traubensaft die Sproßverbände nicht durch aufsteigende Kohlensäurebläschen zerstört werden, so besteht ein solcher oft aus Hunderten von Zellen.

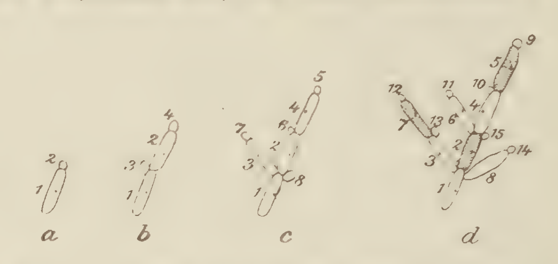


Fig. 87. Bildung eines Sproßverbandes einer *Mycoderma.* Zellen 2, 5 u. 7 in *d* sind von einer Lufthülle umgeben. — Vergr. 600.

Wendet man als Nährboden eine Nährgelatine an, in welcher die Zellen gezwungen sind, sich an Ort und Stelle zu entwickeln, so findet zwar anfänglich eine Sprossung statt, wie sie oben beschrieben wurde, die Tochtersprossen können sich aber nicht wie auf oder in Flüssigkeiten regelrecht ausbreiten, und infolgedessen entsteht wie bei den Bier- oder Weinhefen eine kompakte, kugelige Kolonie.

In betreff der Riesenkolonien (s. S. 23 u. 288) macht LINDNER (1) mit Recht darauf aufmerksam, daß deren Formenreichtum hier größer ist als bei irgend einer anderen Sproßpilzgruppe. „Bald stellen sie mattgraue bis graugelbliche Beläge ohne jede Oberflächenzeichnung dar, bald solche mit blattartiger Nervatur; bald zeigen sie äußerst zarte und dicht aufeinander folgende konzentrische Kreise, oder es treten vom Centrum der Kolonie aus keilförmige Schichten auf, die sich nach außen verbreitern und hierbei zumeist ein mehlartig trockenes Aussehen annehmen, oder es kräuselt sich die ganze Oberfläche in einer Unzahl bald zierlicher, bald grober Falten. Bald erscheint die Kolonie wie ein Hügel, auf dessen Abhang mehrere Ringwälle aufgeworfen sind, bald wie eine

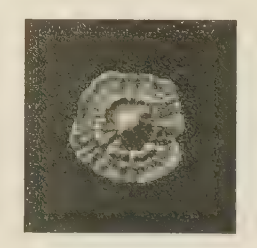


Fig. 88. Riesenkolonie einer *Mycoderma* aus Geisenheimer Johannisbeersaft. Nat. Größe.

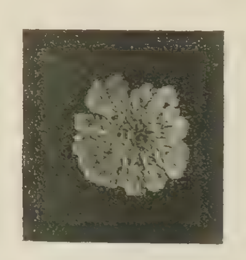


Fig. 89. Riesenkolonie einer *Mycoderma* aus Gau-Algesheimer Traubensaft. Nat. Größe.

Gebirgsmasse, die vom Centrum aus wiederholt dichotomisch verzweigte Ausläufer nach der Ebene sendet, bald wie ein Aetna en miniature, der auf dem gleichmäßig ansteigenden, mit weißem, puderartigem Staub bedeckten Abhang zahlreiche Nebenkrater in Form kleiner, warzenartiger Erhebungen trägt, bald wie ein breiter, runder Kuchen, 5 dessen Oberfläche Risse bekommen hat, durch welche die teigige Masse in Form niederer Wülste hervorquillt, oder wie ein solcher, dessen Masse sich strahlenförmig eingesenkt hat." Diese Schilderung LINDNER's trifft allerdings nur für wenige typische *Mycoderma*-Arten zu. MEISSNER (1) teilt die Riesenkolonien der von ihm untersuchten Mycodermarassen nach 10 ihrer Wachstumsform in vier verschiedene Typen ein. Der 1. Typus stellt glatte Riesenkolonien dar. Die Kolonien der verschiedenen hierher gehörenden Arten unterscheiden sich durch den Glanz der Kolonien, durch die Riefung am Rande, durch das Einwachsen und Verflüssigen der Gelatine, dagegen weniger durch die Größe und Farbe. Der 2. Typus 15 zeigt kreisrunde, kompakte Kolonien, die sich durch die Größe und die Zeichnungen auf der Oberfläche unterscheiden. Beim 3. Typus sind die Riesenkolonien auch kompakter Natur, zeigen aber auf der Oberfläche mehr Zeichnung (wie in *Fig.* 88). Beim 4. Typus ist die Kolonie in der Mitte erhaben, wölbt sich dann konkav zu einem um die Impfzelle kon- 20 zentrisch verlaufenden Ring. Von diesem Ring oder Wall gehen zum Rande der Kolonie Linien radiär, und zwischen diesen Linien bemerkt man unregelmäßige Vertiefungen und Erhöhungen (s. *Fig.* 89). Was die mikroskopische Untersuchung der Zellen betrifft, so bemerkt man, wie WILL (2) und MEISSNER (1) nachgewiesen haben, daß die Zellen der Rand- 25 partie der Riesenkolonie größere Länge erreichen, als die Zellen im Centrum.

An Stichkulturen zeigte WILL (2), daß die von ihm untersuchte Art — sie wuchs 60 mm innerhalb der Gelatine — ein ziemliches Maß von Luftentziehung verträgt. Die Strichkulturen von 30 WILL's Art zeigten nach 15 Tagen keine charakteristischen Merkmale.

§ 68. Deckenbildung und deren Begleiterscheinungen.

Allen Mycodermen gemeinsam ist die Bildung von Decken auf der Oberfläche der von ihnen besiedelten Flüssigkeiten (Bier, Wein, Bierwürze, Trauben- und Obstsaft, Obstwein, Destillationsrückstände von 35 Bier und Wein usw.). Da drängt sich sofort die Frage auf: Warum kommt es gerade bei den Mycodermen allgemein zur Bildung einer Decke, während doch von den gleichgestalteten Weinhefen nur einige Rassen diese Erscheinung und auch dann nicht in so ausgesprochenem Maße zeigen? 40

Man hat sich früher mit der Erklärung abgefunden, daß die Mycodermen eben sauerstoffbedürftige Organismen sind und als solche also zur Deckenbildung schreiten. Erklärt ist aber damit diese Erscheinung noch nicht. LINDNER (1) und WILL (1) sind der Ansicht, daß die Zellen der Mycodermen schwer von Wasser benetzbar sind (s. S. 287) 45 und Luft zwischen sich einschließen, bezw. daß Luft ihnen adhäriert, und daß es ihnen infolge dieser Beschaffenheit wahrscheinlich ermöglicht wird, sich so leicht an der Oberfläche zu halten. Die Untersuchungen MEISSNER's (1) haben in dieser Hinsicht unzweifelhaft ergeben, daß die Luft allein die Trägerin der Kahmdecken ist, die an sich spezifisch 50

schwerer als z. B. Traubensaft sind. Diese Luft setzt sich in den oft aus Hunderten von Zellen aufgebauten, ästig reich verzweigten, besenförmigen Sproßverbänden der Mycodermen fest. Die Sproßverbände der Weinhefen dagegen werden vor Beginn der Gärung aus verhältnismäßig 5 wenigen Zellen zusammengesetzt; zudem kommt noch, daß nach WORTMANN (1) infolge der alkoholischen Gärung bezw. „durch die von der Hefe bald in immer stärkerem Maße gebildete und unter Aufbrausen in kleinen Bläschen nach oben steigende Kohlensäure die kleinen Hefenzellen in tollem Tanz umhergewirbelt und frühzeitig voneinander ge- 10 rissen werden." Die Sproßverbände der Mycodermen dagegen können sich in ruhigen Flüssigkeiten entwickeln, und daher resultiert ihr großer Reichtum an Zellen.

Wenn man einige Zellen irgend einer *Mycoderma* in Traubensaft aussäet — und dieselben Erscheinungen würden sich ergeben, wenn man 15 Bier oder Wein beimpfte —, so zeigen sich in bezug auf Deckenbildung nach den eingehenden Untersuchungen MEISSNER's (1) die gleichen Erscheinungen wie bei manchen hautbildenden Torulaceen: Schon nach verhältnismäßig kurzer Zeit tritt auf der Oberfläche der Flüssigkeit eine Decke auf, die entweder durch Vereinigung ursprünglich getrennter Inseln 20 oder durch ein stetig fortschreitendes Wachstum von der Gefäßwandung aus entsteht. In der ersten Entwicklung ist die Decke in allen untersuchten Fällen zart, eben und sehr elastisch. Auf der matten, dünnen Haut, von der ein Teil manchmal auch glänzend ist, treten, deutlich oder undeutlich erkennbar, zerstreut oder in gewundenen Linien an- 25 geordnet, zahlreiche oder wenige weiße Punkte auf. Diese können wieder größer oder kleiner sein und stellen Anhäufungen von Zellen dar, die zwischen ihren Sproßverbänden Luft enthalten. Eine Eigentümlichkeit mancher Mycodermen, auf die auch LINDNER (1) und WILL (1) aufmerksam gemacht haben, besteht darin, daß die von diesen Pilzen gebildete 30 Haut im ersten Stadium manchmal löcherig ist. Durch das weitere Wachstum der Zellen verschwinden aber die freien Stellen innerhalb der Kahmhaut. Die Erscheinung bedarf noch der Aufklärung.

Infolge des fortschreitenden Wachstums der Zellen treten aber, wie wiederum bei manchen hautbildenden Torulaceen, Aderungen, 35 Faltungen, Runzelungen der glatten, farblosen Haut auf, und zwar bei der einen Rasse früher, bei anderen später. Die erste Faltung ist bei den verschiedenen Rassen wiederum verschieden. Nach den Untersuchungen MEISSNER's lassen sich folgende vier Gruppen

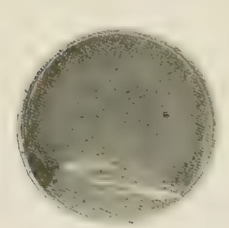


Fig. 90. Mycoderma aus Rotwein von Eltville. Erstes Stadium der Deckenbildung. Etwas verkleinert.



Fig. 91. Mycoderma aus Gubener Apfelwein. Erstes Stadium der Deckenbildung.—Etwas verkleinert.

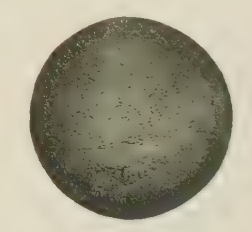


Fig. 92. Mycoderma aus Berliner Weißbier. Erstes Stadium der Deckenbildung. Etwas verkleinert.

deutlich unterscheiden: Die erste Gruppe zeigt breite, blasenförmig aufgetriebene Adern (s. *Fig. 90*). In der zweiten und dritten Gruppe nimmt die Breite der Adern ab (s. *Fig. 91* und *92*). Die vierte Gruppe endlich zeigt ähnliche, aber ganz feine, zierliche Aderbildung in der Decke; der Aderung der Haut kann unter Umständen, und zwar meist dann, wenn sich zwischen der Decke oder am Rande des Zuchtgefäßes einzelne unbedeckte Flüssigkeitsstellen befinden, eine geradlinig verlaufende Faltung der Haut vorausgehen. Bei weiterem Wachstum der Haut geht die Aderform entweder in eine gekröseartig gestaltete über oder nimmt Linienform an. Die erstere Form ähnelt sehr einem lockeren Gewebe, dessen einzelne Fäden wirr durcheinander verschlungen sind. Diese Fäden können nun aber entweder grob oder fein sein. Bei der Linienform gehen die Linien entweder von einem excentrischen Punkt der Decke oder von einem Punkt der Glaswand aus, an der die Zellen sämtlicher Mycodermarassen ein Stück emporsteigen, von mehreren Centren der Decke oder von einem freien Raum der Nährflüssigkeit innerhalb der Decke. Endlich können auch die Linien, die nach einer Richtung laufen, gleichmäßig auf der Decke verteilt sein. Im weiteren Verlauf des Wachstums treten in der Faltung Aenderungen ein. Die zunächst gekröseartig wachsenden Kulturen zeigen verschieden tiefe Runzelung. Nach den Untersuchungen MEISSNER's (1) konnten fünf Gruppen unterschieden werden. Runzelung I ist blumenkohlähnlich. Die Furchen der Runzelung II sind weniger tief. Die Runzelung III ist gleichmäßiger und feiner. Die Runzelung IV ist noch feiner. Die Runzelung V endlich zeigt ganz feine Runzeln.

Wie die Form, so ist auch die Farbe der Kahmhaut in den verschiedenen Altersstadien und bei den verschiedenen Rassen eine verschiedene. Wenn die Haut noch ganz dünn ist, zeigt sie keine besondere Farbe; nur einzelne Punkte in ihr sehen, wie schon oben erwähnt wurde, weiß aus. Das sind die Punkte, an denen die Haut bereits etwas dicker geworden ist und viel Luft zwischen den einzelnen Zellen enthält. In dem Maße, als nun die Faltung der Decke, bezw. das Wachstum der Zellen vorwärts schreitet, färbt sich die Decke infolge der Lufteinschließung zunächst weiß. Ist die Decke bereits dicker geworden, so erscheint sie weißgrau, weißgelblich, weißolivengrün, violett, gelb, gelbrötlich usw. Bei einigen Arten kommt es zur Bildung einer dicken Decke, bei anderen bleibt die Haut dünn. Im allgemeinen treten die runzeligen Decken in starker Mächtigkeit auf, und mit der Zunahme der Feinheit der Runzelung nimmt die Dicke der Decke ab.

Betrachten wir nun die Begleiterscheinungen bei der Bildung der Kahmhaut. Bildet diese sich auf einer Nährflüssigkeit, so bleibt letztere entweder klar oder sie trübt sich nach einiger Zeit, oder aber es tritt schon während der Deckenbildung eine Trübung ein. Diese Erscheinungen sind dadurch bedingt, daß die die Trübung hervorrufenden Mycodermen nur in losem Sproßverband miteinander bleiben und sich in der Flüssigkeit leicht verteilen. Je nach dem Grade der Loslösung erhält man eine größere oder geringere Trübung der Nährflüssigkeit. Bei einer Reihe von Mycodermen erfolgt ein derartiges Loslösen erst nach einiger Zeit. Hierbei sind nun wieder zwei Fälle streng voneinander zu scheiden: 1) entweder lösen sich größere Flocken von der Decke ab, oder 2) kleine Sproßverbände. Am Boden des Zuchtgefäßes liegend, sterben die Mycodermen nicht sofort ab; im Gegenteil, es sind diese Zellen sehr widerstandsfähig, sie bilden von

Zeit zu Zeit immer wieder neue Sproßzellen. Wortmann (2) ist es gelungen, aus Weinen, welche 25—33 Jahre in den fest verschlossenen, noch mit dem Originalstopfen versehenen Flaschen gelagert hatten, noch lebende Mycodermen herauszuzüchten.

Die am Boden der Kulturgefäße liegenden, hungernden Zellen können nun aber wieder in die Nährflüssigkeit durch Gasbläschen, die aus dem Bodensatz von Zeit zu Zeit aufsteigen, emporgewirbelt werden. Diese Zellen sind, weil sie ausgehungert sind, spezifisch nicht viel schwerer als die sie umgebende Flüssigkeit, und deshalb wird letztere unter Umständen lange Zeit hindurch getrübt.

Bei dem Wachsen der Mycodermen auf Traubensaft oder Würze kann eine Entfärbung dieser Flüssigkeiten (vergl. S. 290) stattfinden. Will (1) fand durch die Einwirkung der Mycodermen ein Hellerwerden der Würze. Diese Beobachtung konnte Meissner (1) für Traubensaft bestätigen. Letzterer fand aber, daß die hellgelbe Farbe eines Traubensaftes auch in eine dunkelbraune umschlagen kann, wenn bestimmte Mycodermarassen auf diesem Nährboden tätig sind. In diesem Falle werden nämlich alkalisch reagierende Substanzen erzeugt, welche die Säuren des Traubensaftes neutralisieren und die Flüssigkeit schließlich alkalisch machen.

§ 69. Die Säurezerstörung und Säurebildung in den Nährflüssigkeiten durch die Mycodermen

hat Meissner (1) eingehend studiert. Er kommt zu folgenden wesentlichen Resultaten. Durch die bisherigen, von anderen Forschern, so von Koch (1), Wortmann (2) und Will (1), unternommenen Untersuchungen über das physiologische Verhalten der Mycodermen war festgestellt worden, daß diese Pilze keineswegs stets eine Säureverminderung des Traubensaftes, Weines, Bieres usw. bewirken, sondern daß auch einige Rassen oft in beträchtlicher Menge Säure bilden. Diese Erscheinung läßt sich nach den Untersuchungen Meissner's (1) daraus erklären, daß die Mycodermen imstande sind, Säure sowohl zu bilden als auch zu zerstören. Beide Prozesse laufen nebeneinander her. Ob die Säurezerstörung oder aber die Säurebildung überwiegt, hängt, abgesehen von der Fähigkeit der verschiedenen Rassen, von äußeren Umständen ab, z. B. davon, ob mehr oder weniger Luftsauerstoff zu den Zuchten gelangen kann, ob viel oder wenig Nährlösung vorhanden ist u. a. m. Wenn die Säurebildung die Säurezerstörung überwiegt, so ist der Gesamteffekt eine Säurezunahme in der Nährflüssigkeit; im entgegengesetzten Falle, d. h. wenn die Säurezerstörung die Säurebildung übertrifft, zeigt die Nährflüssigkeit eine Abnahme des Gesamtsäuregehaltes. Bleiben beide Prozesse gleich stark, so erhält man die Säuremenge, die man bereits vorher gefunden hatte.

Meissner (2) ist, um einen befriedigenden Einblick in das Wesen der Säureverminderung der von den Mycodermen besiedelten Flüssigkeiten zu gewinnen, der Frage näher getreten, wie sich die Mycodermen verhalten, wenn man sie auf künstlichen Nährlösungen züchtet, die neben den erforderlichen Mineralstoffen als alleinige Quelle organischer Substanz verschiedene organische Säuren enthalten. Aepfelsäure wurde von einigen Rassen nur sehr wenig angegriffen, von anderen dagegen sehr stark. Eine, welche aus einem Colmarer Wein abgeschieden worden

war, verzehrte innerhalb 35 Tagen 5.72 g pro Liter, d. i. 73 Proz. der ursprünglich in der künstlichen Nährlösung vorhanden gewesenen Aepfelsäure. Mit dem starken Zerstören der Aepfelsäure ging ein üppiges Wachsen der Mycodermen parallel. Weinsäure eignet sich im allgemeinen nur schlecht zum Aufbau der Mycodermazellen; sie wird infolgedessen auch nur wenig von den Mycodermen zerstört. Zu dem gleichen Resultate gelangte SEIFERT (1). Anders ist dies bei der Milchsäure: denn MEISSNER (2) fand, daß von neun zum Versuche herangezogenen Stämmen deren sechs die Milchsäure außerordentlich stark verzehrt hatten, drei dagegen entsprechend ihrem geringen Wachstum nur wenig. Eine Rasse aus einem schlesischen Birnenweine hatte die Milchsäure bis auf 0.0673 Proz. (der Anfangssäuregehalt der Nährlösung betrug 0.7633 Proz. Milchsäure) zum Verschwinden gebracht. Wie die Milchsäure, so wurden auch die Citronensäure und die Bernsteinsäure zum Teil stark angegriffen. Von der ersteren war in einem Drittel, von der zweiten in einem Viertel der untersuchten Proben die betreffende Säure nahezu verzehrt; vergl. MEISSNER (3). Die Essigsäure wurde in der Hälfte der Versuche MEISSNER's (3) sehr stark in Angriff genommen, in drei Fällen nur wenig, in weiteren drei Fällen waren die auf die Nährlösungen gesäten Mycodermen überhaupt nicht gewachsen. H. VAN LAER (1) fand bei der Untersuchung einer Mycodermarasse, daß sie in Würze nicht wuchs, sobald 1.25 Proz. Essigsäure vorhanden war, während bei 1 Proz. sehr kräftiges Wachstum stattfand und vier Fünftel der Essigsäure bei 30° C in 10 Tagen verschwanden.

Neben der Säureverzehrung wurde gleichzeitig die Bildung von Säure in den Nährlösungen durch die Tätigkeit der Mycodermen beobachtet. Denn in manchen der untersuchten Nährlösungen hatte trotz der Abnahme der dargebotenen organischen Säuren der Gesamtsäuregehalt der Flüssigkeit zugenommen. In anderen Fällen ergab sich, obwohl ein energisches Wachstum der Decken stattgefunden hatte, ein nur um weniges verminderter Gesamtsäuregehalt.

Die verschiedenen Mycodermen bilden verschiedene flüchtige Säuren, was an dem verschiedenen Geruch der Flüssigkeiten, auf denen sie wachsen, wahrgenommen werden kann. Nach WORTMANN (2) riechen viele kahmig gewordene Weine auffallend nach ranziger Butter. Dieser eigenartige Geruch kommt von der durch die Tätigkeit der Mycodermen entstandenen Buttersäure her, welche sie aus den verschiedenen Bestandteilen des Mostes und Weines zu erzeugen imstande sind. Schon im Jahre 1893 hatte LAFAR (1) einen kahmhautbildenden Sproßpilz aus Faßgeläger einer an Betriebsstörung leidenden Brauerei isoliert, der in der Faltenbildung der Haut *Mycoderma cerevisiae* glich. Der Geruch des Bieres, auf dem der Pilz gezüchtet wurde, war angenehm obstartig; das sauer gewordene Bier hatte einen angenehmen, an Weinessig erinnernden Geschmack. Auch WILL (1) beobachtete, daß die von ihm untersuchte *Mycoderma*-Art in hellem Münchener Bier eine sehr kräftige Säurebildung bewirkte. „Beim Oeffnen der Kulturgefäße war ein säuerlicher Geruch wahrnehmbar, der anfangs einige Aehnlichkeit mit Essigsäure besaß; später war derselbe noch schwerer zu definieren. Er erinnerte an denjenigen gebratener Aepfel. Der Geschmack des Bieres war scharf sauer, aber nicht derjenige von Essigsäure.“ Zu bemerken ist noch, daß zufolge WILL (1) auch RAYMAN und KRUIS in einer Kultur von *Mycoderma*, nachdem sie ein Jahr bei 20° gestanden hatte, Ameisensäure und Essigsäure fanden.

Außer den flüchtigen Säuren werden aber auch fixe Säuren und Ester von den Mycodermen gebildet, was daraus hervorgeht, daß die gebildeten flüchtigen Säuren nicht das Mehr in der Gesamtsäure zu decken vermögen, wenn eine Säurezunahme in der Nährflüssigkeit stattgefunden hat. GRAF (1) teilt mit, daß die von ihm untersuchte *Mycoderma cerevisiae* in steriler Würze eine Säurezunahme bewirkte, so daß nach 28 Tagen der Säuregehalt von 5,7 ccm auf 8,5 ccm Zehntel-Normal-Barytlauge-Verbrauch stieg. Auch die in dem in Aegypten bereiteten, kefirähnlichen, als „Leben" bezeichneten Getränke durch RIST und KHOURY (1) aufgefundene *Mycoderma lebenis* bildete fixe Säure und Essigsäure. WILL (1) vermutet, daß die Säurebildung es ist, welche Einfluß auf die Entfärbung von obergärigem Bier bei Gegenwart größerer Mengen der von ihm untersuchten *Mycoderma*-Art nimmt.

§ 70. Zerstörung und Bildung anderer organischer Substanzen durch die Mycodermen.

Neben den organischen Säuren ist der Alkohol des Bieres, Weines und Obstweines diejenige Substanz, welche der gänzlichen Zerstörung durch die Mycodermen anheimfällt. Durch Oxydationsprozesse entstehen aus ihm Kohlensäure und Wasser, aber er kann von ihnen auch als organischer Baustoff benutzt werden. Zu letzterem Schluß gelangte bereits A. SCHULZ (1), der den Satz aussprach, „daß der Kahmpilz die ihn konstituierenden organischen Verbindungen sich selbst erzeugen kann und hierzu nur des Ammoniaks und des Alkohols bedarf". Dieses Resultat SCHULZ' ist von MEISSNER (1) vollauf bestätigt worden. Ersterer verwendete zu seinen Versuchen eine künstliche Nährlösung, die außer phosphorsaurem Kali und Kalk noch schwefelsaure Magnesia und Alkohol enthielt. Als stickstoffhaltiger Nährstoff war der Nährlösung in einem Falle salpetersaures Ammoniak, im zweiten Asparagin, im dritten Falle weinsaures Ammoniak hinzugefügt. In allen drei Versuchsreihen war der Pilz recht gut gewachsen und ein großer Teil des Alkohols von ihm verzehrt worden, ein Zeichen dafür, daß die Mycodermen befähigt sind, ihren Stickstoffbedarf aus salpetersaurem Ammoniak zu decken und den Alkohol zum Aufbau ihres Zelleibes zu benützen. Es muß allerdings erwähnt werden, daß SCHULZ nicht mit Reinkulturen arbeitete und daß die von ihm verwendete Rasse offenbar zu der Gattung *Pichia* gehörte. Die Untersuchungen MEISSNER's bilden demnach wie auch die schon früher angestellten Untersuchungen WINOGRADSKY's (1), die später von A. KOSSOWICZ (1) bestätigt wurden (s. S. 100), eine wesentliche Ergänzung zu jenen Versuchen. Sie haben gezeigt, daß auch echte Mycodermen in Reinkultur die von SCHULZ zuerst erkannte Tätigkeit ausüben. MEISSNER (4) benützte zu seinen Versuchen außer den oben angegebenen stickstoffhaltigen Nahrungsmitteln noch das Phosphat und das Chlorid des Ammoniums, die er einer künstlichen Nährlösung mit den notwendigen Aschenbestandteilen hinzufügte; und auch diese beiden Stickstoffsubstanzen versorgten die Mycodermen mit Stickstoff, wie aus deren energischem Wachstum hervorging, infolgedessen dann auch der Alkohol der Nährlösung zum Teil veratmet, zum Teil zum Aufbau des Zelleibes benützt wurde.

Die Zuckerarten werden von den verschiedenen Mycodermen in verschiedener Weise und in verschiedenem Grade angegriffen. So

berichtet H. van Laer (1), daß Dextrose durch *Mycoderma* in Nägeli's Nährlösung nicht angegriffen wird, während sie in Hefenwasser ein besseres Nährmittel als Alkohol ist. Maltose und Saccharose wurden in sehr verschiedenem Grade angegriffen, und es zeigte sich auch bei diesen, daß der Abbau völlig von der Natur des Nährmaterials abhängt. „Bei gleichzeitigem Zusatz verschiedener Kohlenstoffquellen zur Nährlösung wird diejenige, welche am leichtesten assimilierbar ist, zuerst abgebaut. Erst nach dem Verschwinden des Alkohols werden die Disaccharide angegriffen.“ Wenn dem Hefenwasser Maltose, Saccharose und Dextrose zugesetzt wurde, so wurde letztere zuerst angegriffen, während die Disaccharide auch hier anfänglich nicht abgebaut wurden. Invertase und Maltase waren in den Mycodermazellen nicht nachweisbar. Die Saccharose und Maltose wurden direkt zu Wasser und Kohlensäure oxydiert. Die Mycodermen Meissner's endlich, welche auf sterilem Traubensaft gezüchtet wurden, veratmeten zum Teil die Dextrose und Lävulose, bildeten aber aus diesen Zuckerarten auch Säuren. Auf künstlichen Nährlösungen, denen außer den notwendigen mineralischen Nährstoffen als alleinige organische Substanz Dextrose oder Saccharose hinzugefügt worden war, oxydierten die Mycodermen die Zuckerarten, verwendeten aber einen Teil derselben auch zur Bildung neuer Zellen und bildeten aus ihnen außerdem noch Säure. Die *Mycoderma lebenis* Rist et Khoury (1) wuchs in Glucose und Maltose ganz vorzüglich, wobei die Glucose in Säure umgewandelt und der Alkohol verbrannt wurde; vergl. darüber Bd. II, S. 136.

Nach weiteren Untersuchungen Meissner's (3) wurden, wie die Säuren, der Alkohol und die Zuckerarten, auch Glycerin und Tannin von den Mycodermen zerstört. Auch eine von Eitner (1) auf Mimosarinde gefundene *Mycoderma*-Art zersetzte Gerbstoff; vergl. Bd. V, S. 31.

Die Mycodermen vermögen aber nicht nur Glycerin zu zerstören, sie sind auch imstande, dasselbe aus anderen organischen Substanzen zu bilden. W. Seifert (1) berichtet, daß seine *Mycoderma vini I* in Pasteur'scher Nährlösung nach 14 Wochen 0,152 Proz. Glycerin erzeugte, während die ganze Alkoholmenge verschwunden war. *Mycoderma vini II* dagegen bildete nur 0,016 Proz. Glycerin; die Alkoholmenge ging gleichzeitig nur von 4,8 auf 4,1 Vol.-Proz. herab.

Ueber Krankheitserscheinungen im Biere durch Mycodermen vergl. man Bd. V, S. 208. Ueber das Auftreten von Mycodermen in Wein und Obstwein besagt das 18. Kapitel des Fünften Bandes das Nähere.

§ 71. Einwirkung äußerer Faktoren auf das Leben der Mycodermen.

Will (1) hat sehr interessante Beobachtungen über die Lebensdauer von *Mycoderma* in Würzekulturen und in trockenem Zustande gemacht. Kulturen, welche viereinhalb Jahre in Würze aufbewahrt worden waren, zeigten nach der Ueberimpfung in frische Würze noch lebendige Zellen. Das ist ein Beweis dafür, daß Mycodermazellen in Würze sehr lange am Leben bleiben können. Ebenso zeigte Will, daß Mycodermen in trockenem Zustande sehr lange lebendig sind, im untersuchten Falle mindestens 2 Jahre lang. Niedere Temperatur ist für eine längere Lebensdauer in trockenem Zustande günstig. Wahrscheinlich spielt auch der Wassergehalt der getrockneten Zellen eine Hauptrolle.

Ebenso hat WILL (1) Untersuchungen über die Widerstandsfähigkeit alter und junger *Mycoderma*-Zellen gegen Erhitzen in Flüssigkeiten angestellt. Das Erhitzen der von WILL untersuchten Art geschah einmal in Wasser, dann in Würze und endlich in Sauerkrautwasser. Die 5 Kulturen waren verschieden alt. Die Erhitzungsdauer betrug mit Ausschluß des Anwärmens eine halbe Stunde. Aus den Versuchen ging mit Sicherheit hervor, daß die Beschaffenheit des Substrates auf die größere oder geringere Widerstandsfähigkeit der Mycodermazellen von Einfluß ist. Ferner ergab sich, daß für das Erhitzen in Wasser die kritische Temperatur 10 für die vorliegende Art bei 50° C liegt, während nach halbstündigem Erhitzen bei 55° C bei allen in Würze erhitzten Kontrollimpfungen noch Mycodermahäute sich entwickelten. Aeltere Kulturen erwiesen sich als widerstandsfähiger als jüngere und ertrugen etwa 5° C mehr als diese. Dabei ist die Ausbildung von Dauerzellen nicht wahrscheinlich, viel- 15 mehr dürften nach WILL die älteren und kräftiger entwickelten Zellen an sich widerstandsfähiger als die zarten jüngeren sein. SEIFERT gibt für die Entwicklungsmöglichkeit der Mycodermen 0°—40° an, wobei ein Alkoholgehalt die Grenzen einengt, so daß sie z. B. in einem Wein von 8 Vol.-Proz. Alkohol 2—33° betragen. Zur Vernichtung der Lebens- 20 fähigkeit der Mycodermen in Wein genügt ein 5 Minuten andauerndes Erwärmen auf 60°.

Was die Einwirkung chemischer Faktoren auf das Leben der Mycodermen betrifft, so beschleunigt nach den Untersuchungen HOLM's und JÖRGENSEN's ein Zusatz geringer Mengen von Fluoriden die Ent- 25 wicklung von *Mycoderma*. SIEBEL fand, daß, wenn man Bier mit einer Lösung von Formalin (40-proz. Formaldehydlösung) im Verhältnis von 1 : 10 000 versetzt hat, sich weder Hefe, noch *Mycoderma*, noch Bakterien entwickeln. In Lösungen von 1 : 50 000 entwickeln sich Hefe und *Mycoderma*, aber keine Bakterien. Nach SEIFERT (1) zeigen die ver- 30 schiedenen Mycodermen sehr verschiedene Widerstandsfähigkeit gegen Alkohol; bei 13 Vol.-Proz. Alkohol hört die Entwicklungsfähigkeit auf. Von Furfurol wirkte eine Menge von 0,5 Proz. auf WILL's *Mycoderma* tödlich. Bekannt ist ferner, daß die schweflige Säure ein außerordentlich starkes Gift für die Mycodermen ist und deshalb auch bei der 35 Heilung kahmig gewordener Getränke Verwendung findet. WESENBERG (1) untersuchte verschiedene Desinfektionsmittel auf ihre abtötende Wirkung, so das **Antigermin**, **Mikrosol**, **Afral**, **Mycelicid** und **Antiformin**, und benutzte, um die Wirkung zu studieren, auch *Mycoderma cerevisiae*. Wurde diese (als eine 4 Tage alte Kultur) in 2-proz. Lösungen 40 jener Desinfektionsmittel gegeben, so wurde sie in Antiformin nach einer Viertelstunde, in Antigermin nach einer Stunde, in Mikrosol nach 8 Stunden, in Mycelicid nach 9 Tagen abgetötet, während das Afral nur ihr Wachstum verlangsamte. In einer 1-proz. Lösung der Gifte starb die *Mycoderma* in Antiformin in einer Viertelstunde, in Antigermin in 45 5 Stunden, in Mikrosol in 8 Stunden ab. Wesentlich andere Resultate wurden aber erhalten, wenn die Desinfektionsmittel in bestimmter Menge zu Bierwürze gegeben wurden. Dann wurde das Wachstum der *Mycoderma* bei folgenden Verdünnungen unterdrückt: bei Antigermin 1 : 1000, bei Mikrosol 1 : 500, bei Antiformin 1 : 20. An der Spitze der geprüften 50 Antiseptica stand also bezüglich der entwicklungshemmenden Kraft unzweifelhaft das Antigermin, welches sich nach WESENBERG als etwa 3- bis 10-mal so stark erwies als das Mikrosol.

Literatur

zum Kapitel Die Mycodermen.

*Eitner, W., (1) Der Gerber, 1898, Bd. 24, S. 4. *Graf, F., (1) 6. Jahresber. d. Lehranstalt u. Versuchsstation München. Brauer-Akademie, pro 1899/1900. *Hoffmann, (1) Bot. Ztg., 1869, S. 309. *Klöcker, A., (1) Die Gärungsorganismen. Stuttgart 1900, S. 242. *Koch, A., (1) Weinbau u. Weinhandel, 1898, S. 236. *Kossowicz, Alex., (1) Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen in Oesterreich, 1906, Bd. 9, S. 688. *van Laer, H., (1) J. federated Inst. Brewing, 1901, Bd. 7, S. 337. *Lafar, F., (1) Centralbl. f. Bakt., 1893, Bd. 13, S. 684. *Lindner, P., (1) Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben, 3. Aufl. Berlin 1901. *Mayer, Ad., (1) Untersuchungen ü. d. alkoholische Gärung. Heidelberg 1869, S. 47—51. *Meissner, Rich., (1) Landw. Jahrbücher, 1901, Bd. 30, S. 497. — (2) 2. Bericht der Kgl. Württ. Weinbau-Versuchsanstalt Weinsberg. 1904. S. 72. — (3) Württ. Wochenbl. f. Landwirtschaft, 1901, S. 755. — (4) 1. Bericht d. Kgl. Württ. Weinbau-Versuchsanstalt Weinsberg, 1901—1903, S. 49. *Reess, Max, (1) Botanische Untersuchungen ü. d. Alkoholgärungspilze. Leipzig 1870, S. 71. *Rist, E., und Khoury, J., (1) Ann. Pasteur, 1902, Bd. 16, S. 65. *Schulz, A., (1) Ann. d. Oenologie, 1878, Bd. 7, S. 115. *Seifert, W., (1) Bericht ü. d. Tätigkeit d. K. K. chem.-physiol. Versuchsstation Klosterneuburg, 1899. *Wesenberg, G., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 627. *Will, H., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1899, Bd. 22, S. 391. — (2) Ebenda, 1900, Bd. 23, S. 185. *Winogradsky, (1) Arb. d. St. Petersburger Naturf. Gesellsch., 1884, Bd. 14, S. 132. *Wortmann, Jul., (1) Anwendung u. Wirkung reiner Hefen in der Weinbereitung. Berlin 1895, S. 7. — (2) Die wissenschaftl. Grundlagen d. Weinbereitung u. Kellerwirtschaft. Berlin 1905, S. 45.

(Manuskript-Einlauf: 10. Juni 1906.)

15. Kapitel.

Saccharomyces apiculatus.

Von Prof. Dr. H. Müller-Thurgau,
Direktor der Schweizer. Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau zu Wädenswil bei Zürich.

§ 72. Geschichtliches, Verbreitung und Morphologie.

Auf reifen süßen Früchten findet sich häufig ein Sproßpilz, den man im Hinblick auf seine zweiseitig zugespitzte Gestalt als zugespitzte Hefe, *Saccharomyces apiculatus*, bezeichnet hat. Dieser Pilz ist es wohl, der von Kützing als *Cryptococcus vini* beschrieben worden ist. 5 Nähere Untersuchungen darüber, wie auch die Einführung der neuen Bezeichnung *Saccharomyces apiculatus* in die Literatur verdanken wir erst M. Reess (1). Dieser Forscher hatte den betreffenden Sproßpilz in gärenden Fruchtsäften und Weinmosten vergesellschaftet mit verschiedenen Saccharomyceten angetroffen. Er hatte aber niemals vermocht, ihn zur 10 Bildung von Ascosporen zu veranlassen. Wenn Reess nun das von ihm für die Gattung *Saccharomyces* aufgestellte Merkmal der Hervorbringung endogener Sporen (s. S. 169) hier außer acht ließ und dem fraglichen Sproßpilze dessen ungeachtet den Gattungsnamen *Saccharomyces* zuteilte, so tat er dies mit Rücksicht auf „seine bekannten morphologischen Er- 15 scheinungen und sein physiologisches Verhalten als Alkoholfermentpilz“, sowie „in der Erwartung, daß bei irgend einem anderen Kulturverfahren seine Ascosporenbildung sich noch werde auffinden lassen“. Bis vor kurzem war ein solches Verfahren noch nicht aufgefunden worden.

Hansen (1) hat danach erfolglos Nachsuche gehalten, desgleichen auch A. Klöcker (1) gelegentlich einer von Beijerinck (1) gemachten gegenteiligen Behauptung. Der sogen. *Saccharomyces apiculatus* mußte also bis zur Erfüllung jener Voraussetzung außerhalb der Familie der Saccharo-
5 myceten verbleiben. Wenn man ihm dennoch die von Reess gegebene Bezeichnung beließ, so geschah es aus Abneigung, einen altbekannten Organismus mit einem neuen Namen zu belegen.

Eine ganz neuartige Fruchtform wollte Engel (1) bei dem in Rede stehenden Pilze gefunden haben, ähnlich derjenigen von *Protomyces* (s.
10 Bd. I, S. 209), und er gab ihm, um dieser Beobachtung Rechnung zu tragen, den neuen Gattungsnamen *Carpozyma*. Allein niemand sonst, so auch E. Chr. Hansen (1) nicht, der die Versuche von Engel wiederholte, hat von jener angeblichen Fruchtform etwas bemerken können. Die systematische Stellung des Pilzes blieb also auch weiterhin unbe-
15 stimmt, und aus diesem Grunde wurde er bei Verteilung des Stoffes für dieses Handbuch von den übrigen Saccharomyceten getrennt; vergl. S. 169.

Seitdem hat P. Lindner (1) bei einer aus Robinia-Blüten gewonnenen Apiculatushefe bei Kultur in Bierwürze Zellen mit je einer Spore erhalten. Die solche Zellen darstellende Abbildung ist allerdings nicht
20 sehr beweisend, zumal wenn man berücksichtigt, daß in den Apiculatushefen unter gewissen Lebensverhältnissen sich oft vereinzelte große Fettkörper bilden, die leicht Sporen vortäuschen können. Schon Reess (1) hat übrigens Apiculatuszellen mit je einem runden, stark lichtbrechenden sporenähnlichen Körper abgebildet, und solche ausdrücklich als fragliche
25 Sporenbildung bezeichnet. Die Angabe Lindner's, daß je nur eine Spore in einer Zelle vorkomme, steht nicht in Einklang mit einer früheren Mitteilung Beijerinck's, nach der einzelne Apiculatuszellen zu Asken mit 4—6 Ascosporen angeschwollen seien. Weder Beijerinck noch Lindner ist es gelungen, die „Sporen" zur Keimung zu bringen.
30 Letzterer macht selbst auf diesen Mangel aufmerksam und weist darauf hin, daß ähnlich, wie die Samen des Johannisbrotbaumes nur keimen, nachdem sie den Darmkanal eines Tieres passiert haben, vielleicht auch bei den Apiculatushefen eine solche Vorbereitung zur Keimung erforderlich sei. Diesen Gedanken berücksichtigend, züchtete A. Röhling (1)
35 zunächst kräftige Apiculatushefe durch 24-stündige Kultur in sterilisiertem Traubensaft bei 25° und verwendete diese zu Gipsblöckchenkulturen. Am 10. Tage (Temp.?) fand sich in vielen Zellen je ein „sporenähnliches Gebilde" vor. In einem Gemisch von Pferdemistdekokt mit 5 Proz. Traubenzucker konnte dann die Keimung einer Spore be-
40 obachtet werden. Der Umstand, daß dies nur bei einer Zelle gelang bezw. beschrieben wurde, sowie die Art, wie die Keimung stattfand, erfordern eine Wiederholung des Versuches. Der Verfasser hat in genau nach Röhling's Angaben angestellten Versuchen bei vier verschiedenen Apiculatusrassen keine Sporen erhalten.

45 Lindner und Röhling haben aus ihren Beobachtungen geschlossen, daß die Apiculatushefe Sporen bilde und also wirklich zu der Reess'schen bezw. Hansen'schen Gattung *Saccharomyces* gehöre. Da sie aber einen eigenen Typus darstellt, hält Lindner (3) die Aufstellung einer neuen Gattung für zweckmäßig und schlägt hierfür den Namen *Hansenia* vor;
50 vergl. S. 181.

Der Speciesname *apiculatus* drückt sehr gut jenes Merkmal aus, durch das dieser Sproßpilz sich von allen anderen unterscheidet. Seine (im übrigen eiförmigen) Zellen sind an beiden Polen zugespitzt, so daß

sie in der Form ähnlich einer Citrone sind, wie *Fig. 93* zeigt. Diese Zellgestalt ist jedoch nur in den ersten Stufen der Entwicklung einer Zucht in Nährlösung die vorherrschende. Später, wenn die Ernährungsbedingungen weniger günstig sind, entstehen beträchtlich mehr Zellen von Ei- oder ovaler Gestalt, die Citronengestalt hingegen tritt zurück. 5



Fig. 93. Saccharomyces apiculatus. Typische Form. Vermehrung der Zellen durch Sprossung. Vergr. ca. 950. Nach HANSEN.

Wie schon dargetan, erfolgt die Zellvermehrung bei diesem Pilze ganz oder, falls doch Sporenbildung 10 stattfindet, fast ausschließlich durch Sprossung. Schon REESS und ENGEL haben diesen Vorgang 15 beschrieben; näher untersucht wurde er durch HANSEN, nach dessen Beobachtungen er bei einer citronen- 20 förmigen Zelle folgendermaßen verläuft (s. *Fig. 93*). Das untere der beiden zugespitzten Enden der Zelle 25 in *a* schwillt an (*a'*) und wächst zur normalen Größe (*a''*) heran. Die beiden Zellen treten dann außer Verband, worauf jede die ihr noch fehlende zweite Spitze hervortreibt. Aus *b*—*b''* ersehen wir, daß die Bildung von je einer Knospe gleichzeitig an beiden Enden eintreten kann. Die 30 Fig. *c*—*c'* stellt einen viergliedrigen Sprossverband citronenförmiger Zellen dar. Die Frage, ob auch durch Sprossung einer eiförmigen Zelle eine solche von Citronengestalt hervorgehen könne, ist bejahend zu beantworten. In diesem Falle treibt die Mutterzelle (*e*) an dem einen ihrer Pole eine Knospe hervor, während der andere sich zuspitzt (*e'*), 35 die Tochterzelle vergrößert sich rasch (*e''*), tritt dann außer Verband, und sie, wie auch die Mutterzelle, spitzt sich auch an ihrem zweiten Ende zu. R. MEISSNER (1) hält die ovale Form für die normale, die Spitzen der zugespitzten Form als die Anfänge von Sprossen; doch dürfte dem kaum zuzustimmen sein, man müßte denn annehmen, daß die 40 Mehrzahl der Zellen gerade im Beginn des Sprossens das Wachstum einstellt.

Eigenartig ist die Zellform des von LINDNER (4) entdeckten *Sacch. apiculatus var. parasiticus* LINDNER, der in Schildläusen lebt. Das eine Ende ist bei den meisten Zellen zu einer Spitze stark ausgezogen, wo- 45 durch die Infektion der Eier im Muttertiere und damit die Verbreitung auf die Nachkommen ermöglicht wird.

Außer den bisher beschriebenen ovalen und citronenförmigen Zellen bildet dieser Sproßpilz auch wurstähnliche Wuchsgestalten, wie die *Fig. 94* zeigt. Die äußeren Bedingungen ihrer Entstehung sind 50 noch genauer zu erforschen. Die Beobachtung von REESS, daß diese Gestalten zu Ende der Gärung auftreten, bedarf, weil nicht an Reinzuchten gewonnen, noch der Ueberprüfung. Das Auswachsen des Pilzes

zu mycelähnlichen Gebilden hat man jedoch bisher niemals beobachten können. Auch größere Sproßverbände kommen bei dieser Hefenart nicht zustande; die neugebildeten Zellen lösen sich bald von der Mutterzelle, und zwar nach einer eigentümlichen Umknickung, die schon von REESS (1) genauer beschrieben wurde.

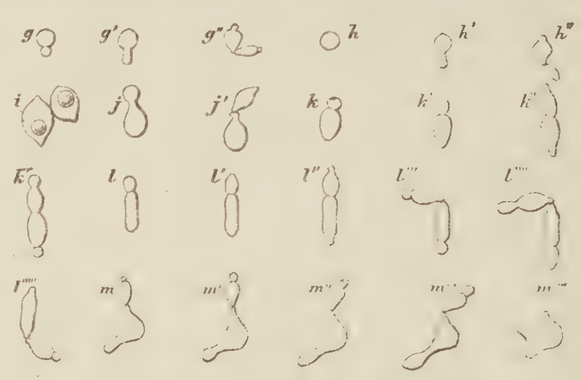


Fig. 94. Saccharomyces apiculatus. Abnorme Zellformen. — Vergr. ca. 950. Nach HANSEN.

Die Größe der Zellen ist, wie bei den echten Saccharomyceten so auch hier, ziemlich beträchtlichen Schwankungen unterworfen. In ein und derselben Zucht kann man Zellen finden, deren Längsdurchmesser 2 μ beträgt, neben solchen von vierfacher Länge. In der Mehrzahl der Fälle beträgt diese 7 μ, steht also gegen diejenige der Bierhefenrassen stark zurück. Dies läßt sich auch aus der *Fig. 95* entnehmen, die in ca. 950-facher Vergrößerung das mikroskopische Bild eines Gemisches von *Sacch. cerevisiae* und *Sacch. apiculatus* wiedergibt. Der erstere ist an den größeren Abmessungen sowie an der Eigestalt seiner Zellen leicht zu erkennen; die Zellen der zugespitzten Hefe hinwieder zeigen hier noch jenes Merkmal, das bei diesem Pilze sehr gewöhnlich ist, zumal wenn er sich in ungünstigen Nahrungsverhältnissen befindet, nämlich das Vorkommen einer großen Vakuole. Weitere morphologische Eigenheiten des Baues der Zellmembran oder des Zellinhaltes, durch die sich die Apiculatushefen von den übrigen Saccharomyceten unterscheiden würden, sind bisher nicht bekannt gegeben worden.

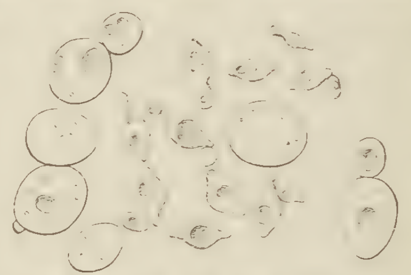


Fig. 95. Zellen von *Sacch. apiculatus* und *Sacch. cerevisiae.* — Vergr. ca. 950. Nach HANSEN.

Fertigt man mit einem Gemisch von *Sacch. apiculatus* und *Sacch. ellipsoideus* Plattenkulturen in Mostgelatine an, so werden die Kolonien von *S. apiculatus* in der Regel erst sichtbar, nachdem die von *S. ellipsoideus* schon eine ziemliche Größe erreicht haben, und auch später zeichnen sie sich durch eine geringere Größe aus. Es ist dies nicht etwa auf eine geringere Vermehrungsgeschwindigkeit, die der ersteren Hefenart an und für sich zukäme, zurückzuführen, sondern in erster Linie auf die schon anfänglich geringere, mit Zunahme der Kolonie noch weiterhin abnehmende Größe der einzelnen Zellen. Schon frühzeitig wird die Gelatine um Apiculatuskolonien herum verflüssigt, und es scheinen von dieser zudem Stoffe ausgeschieden zu werden, die dann nachteilig auf die weitere Vermehrung der Hefenzellen einwirken. Auch bei der Entwicklung von Strichkulturen der Apiculatushefen läßt

sich solches beobachten, so daß diese meist nur zart, schleierartig dünn aussehen, zu einer Zeit, wo der Hefenstrich gleichalteriger Kulturen von *Sacch. ellipsoideus* schon dicke weiße Streifen darstellt. Selbst bei längerer Dauer gelangen jene meist nicht zu kräftiger Entwicklung, was auch von den Riesenkolonien gilt, die in ihrer Gestaltung nur wenig hervortretende besondere Merkmale bieten und bald in die verflüssigte Gelatine einsinken. Näheres hierüber noch im folgenden Paragraphen.

§ 73. Stammesverschiedenheiten.

Von den bei der Bier- und Weingärung mitwirkenden Apiculatushefen ist zunächst als besondere Varietät der *Sacch. apiculatus var. parasiticus* (s. S. 317) abzutrennen, da er sich von den übrigen nicht allein durch die Zellform sondern auch, und zwar schärfer noch, durch die streng parasitische Lebensweise unterscheidet. Weder in Fruchtsäften noch in künstlichen Nährmedien ließ sich diese Varietät züchten. Aber auch die auf den Früchten heimischen und bei der Weingärung regelmäßig beteiligten Apiculatushefen sind nicht eine Einheit, sondern gehören verschiedenen Stämmen an. Es war K. AMTHOR (1), der im Jahre 1888 zuerst bemerkt hat, daß die Species *Saccharomyces apiculatus* verschiedene Rassen umfasse. Als Nachweis der Verschiedenheit konnten bei der Unfähigkeit zur Sporenbildung und bei der großen Wandelbarkeit der Zellgestalt in erster Linie nur Merkmale chemisch-physiologischer Natur herangezogen werden, also insbesondere die Art und Menge der Stoffwechselprodukte, die unter gleichen Bedingungen der Entwicklung von Zuchten verschiedener Herkunft ausgeschieden werden. So vermochte AMTHOR die Rassenverschiedenheit zweier Reinzuchten von *Sacch. apiculatus* zu erweisen, von denen die eine aus einem Heilbronner roten Traubenmost, die andere hingegen aus einem Rheinhessischen weißen Most stammte. Während jene erste Hefenrasse in dem mit ihr zur Vergärung angesetzten Traubenmoste 3,65 Gew.-Proz. Alkohol und 365 mg Glycerin in 100 ccm erzeugte, brachte es die zweite unter ganz gleichen Bedingungen nur auf 2,58 Proz. Alkohol und 311 mg Glycerin. Dafür aber hatte diese eine größere Menge flüchtiger Säure gebildet, und zwar 127 mg pro 100 ccm gegenüber 103 bei der Heilbronner. MÜLLER-THURGAU (2) prüfte sodann sieben verschiedene von ihm gezüchtete Rassen von *Sacch. apiculatus* in Traubensaft, sowie in Birnen- und Johannisbeersaft. Die Menge des gebildeten Alkohols schwankte in Traubensaft zwischen 2,5 und 3,8 Gew.-Proz. Nach der Schnelligkeit der Gärung geordnet, ergab sich in allen drei Gärflüssigkeiten die nämliche Reihenfolge. Bei allen war der Gehalt des Gärproduktes an flüchtiger Säure ein hoher, bei Rasse 8 z. B. in Traubenwein 93 mg pro 100 ccm, in Birnenwein 123 mg (als Essigsäure berechnet), während sie z. B. bei der elliptischen Hefe *Steinberg 1* in den gleichen Flüssigkeiten nur 53 und 47 mg betrug. SCHANDER (1), der später 24 Apiculatushefen in Reinzucht verglich, fand auch einen Unterschied in der Zellform. Bei den einen Rassen sind die Zellen kurz, dick und typisch citronenförmig, bei den anderen dünn und langgestreckt, die Citronenform weniger deutlich hervortreten lassend. Ebenso unterscheiden sich einzelne Stämme durch die Größe ihrer Zellen. Während ältere Kulturen von Apiculatushefen in Obst- oder Traubensäften an der Oberfläche in

der Regel keine Hautbildung zeigen, konnte bei einigen Stämmen eine solche, wenn auch in schwacher Ausbildung, wahrgenommen werden. Ebenso erstreckte sich die Rassenverschiedenheit auch auf die Gestaltung der Strich- und Rundkulturen (Riesenkolonien), wenn auch die 5 Unterschiede nicht stark hervortraten. Deutlichere Abweichungen machten sich in der Menge und Beschaffenheit des Trubs der damit vergorenen Weine und im Alkoholgehalt bemerkbar, der bei der schwächsten Rasse 1,44 g, bei der stärksten 4,53 g in 100 ccm betrug. Auch im Säureverbrauch verhielten sich die Stämme ungleich. Einige weitere Stammesverschiedenheiten werden noch in den beiden folgenden Paragraphen zu erwähnen sein.

§ 74. Wachstums- und Ernährungsverhältnisse.

In flüssigen Medien, wie in Bierwürze und in Fruchtsäften, schreitet die Zellvermehrung der Apiculatushefen im Anfang der Gärung 15 rasch voran, oft rascher als bei den in der Technik bevorzugten Gärungserregern; doch schwindet diese Ueberlegenheit bald wegen der Empfindlichkeit dieser Hefen gegen Alkohol. Am deutlichsten kommt sie daher dann zur Geltung, wenn die Vermehrungsgeschwindigkeit von Apiculatushefen mit der von Ellipsoideusrassen in stark verdünnten Mosten ver- 20 glichen wird, wo es zu einem starken, wachstumshemmenden Einfluß des Alkohols überhaupt nicht kommt, oder wenn in gewöhnlichen Mosten nur die anfängliche Vermehrung, vielleicht bis zur Bildung von 1 Proz. Alkohol, in Betracht gezogen wird. Genauere Versuchsergebnisse dieser Art wurden allerdings noch nicht veröffentlicht, ebenso nicht über den 25 Alkoholgehalt, der das Wachstum unter verschiedenen sonstigen Lebensbedingungen zum Stillstand bringt. Zur Orientierung über die Schwierigkeiten, die sich solchen Bestimmungen entgegenstellen, ist auch der § 28 dieses Bandes nachzusehen. Einige von E. Hansen (1) ausgeführte Versuche lassen die raschere Zellvermehrung von *Sacch. apiculatus* im Ver- 30 gleich zu einer Brauereiunterhefe deutlich erkennen und zeigen fernerhin, wie von den beiden Sproßpilzen beim Zusammenleben in der gleichen Nährlösung der eine den anderen im Wachstum hemmt. So wurden z. B. drei Pasteurkolben mit Bierwürze beschickt: *A* erhielt als Aussaat pro Volumeneinheit 22 Zellen *Sacch. cerevisiae*, *B* ebenfalls und dazu 35 19 Apiculatuszellen und *C* nur 20 von den letzteren Zellen. Nach 13 Tagen (bei 8—10°) war die Zahl der Zellen pro Einheit folgende (Alkoholgehalt in Klammern): *A* 242 *Sacch. cerev.* (6 Vol.-Proz.), *B* 240 *Sacch. cerev.* und 45 *Sacch. apic.* (6 Vol.-Proz.), *C* 791 *Sacch. apic.* (0,5 Vol. Proz.). Der *Sacch. apiculatus* hat sich also in Reinkultur mehr als drei- 40 mal so stark vermehrt als *Sacch. cerevisiae*, wurde aber in Mischkultur von letzterem stark gehemmt. Selbstverständlich geben diese Zahlen jedoch keinen Maßstab für die Wachstumsgeschwindigkeit; denn bei gleichem Wachstumszuwachs werden in der Regel mehr als je drei Apiculatuszellen gebildet werden müssen für je eine der weitaus volumi- 45 nöseren Zellen der Brauereihefe. Damit stimmt dann auch überein, daß die Trube von mit *Sacch. apiculatus* vergorenen Obstsäften trotz der größeren Hefenzahl an Volumen und Gewicht geringer sind als diejenigen der mit *Sacch. ellipsoideus* vergorenen. Um zu entscheiden, ob das Protoplasma der Apiculatushefe eine geringere Gärungsenergie besitzt als das 50 eines *Sacch. cerevisiae* oder *Sacch. ellipsoideus*, darf also nicht die Wirk-

samkeit der gleichen Hefenzahl, sondern soll eher die des gleichen Hefengewichts verglichen werden. Man vergleiche auch Bd. V, S. 139.

Ueber den Einfluß des Alkohols auf das Wachstum mehrerer Apiculatusrassen wurden von Röhling (1) einige Versuche angestellt. Der überhaupt geringen Widerstandsfähigkeit dieser Hefen gegenüber schädlichen Einflüssen entsprechend, genügt schon ein kleiner Prozentgehalt Alkohol in der Kulturflüssigkeit, um die Zellvermehrung beträchtlich zu hemmen. War die Anzahl der Hefenzellen in der Volumeneinheit des Traubenmostes vor der Gärung = 1, so betrug sie bei einer der Rassen nach Abschluß der Gärung ohne Alkoholzusatz 514; wurde dem Moste anfangs 2,86 Vol.-Proz. Alkohol zugefügt, 192, und bei einem anfänglichen Zusatz von 4,62 Vol.-Proz. Alkohol nur 88.

Das besonders häufige Vorkommen der Apiculatushefe auf Beerenobst könnte zu der Annahme führen, es seien die Säfte dieser Früchte für das Gedeihen dieses Sproßpilzes besonders günstig. Bei vergleichenden Versuchen läßt sich jedoch eine solche Begünstigung nicht beobachten. Ob ein Fruchtsaft hauptsächlich Aepfelsäure oder Weinsäure enthält, übt nach Müller-Thurgau (2) auf die Entwicklung des *Sacch. apiculatus* keinen wesentlichen Einfluß aus.

Ganz bedeutend kann dagegen das Wachstum dieser Hefe durch den Zutritt von freiem Sauerstoff (vergl. S. 122) gefördert werden. Es geht dies schon aus dem Verhalten von Stichkulturen in Mostgelatine hervor, wo sich die Hefenzellen nur im oberen Teile des Stiches stärker vermehren. Genaueren Aufschluß gibt ein Versuch von Röhling (1), bei welchem fünf verschiedene Apiculatusrassen in Traubensaft ausgesät und dieser in den einen Gärgefäßen gelüftet wurde, in den anderen nicht. Schon am zweiten Tage war ein Unterschied zugunsten der mit Sauerstoff versehenen Hefen zu bemerken, und am Ende der Gärung betrug in den gelüfteten Proben die Zahl der Hefenzellen je nach der Rasse das 3,3- bis 9,3-fache von den in den nicht-gelüfteten Proben. Hiermit im Einklang scheint es zu stehen, wenn bei der in offenen Standen gärenden Rotweinmaische in der oberflächlichen Schicht, zumal im Schaume, der Prozentsatz apiculater Hefenzellen gelegentlich bedeutender ist als in den tieferen, sauerstoffärmeren Schichten. Diesem Sauerstoffbedürfnis wird natürlich sehr gut entsprochen, wenn die Sproßpilze auf der Oberfläche fester Nährsubstrate wachsen, und es ist nicht ausgeschlossen, daß der *Sacch. apiculatus* infolge dieses ihn ganz besonders begünstigenden Umstandes unter solchen Verhältnissen obsiegt. In den Wunden aufgesprungener oder angefressener Traubenbeeren sowie in den von Apfelwicklerraupen gefressenen Gängen in Kernobst findet man denn auch nicht selten beträchtliche Anhäufungen von Apiculatushefe, sozusagen als Reinkultur.

Die speziellen Ernährungsverhältnisse unseres Sproßpilzes sind noch wenig erforscht. Seinen Kohlenstoffbedarf deckt er in der Hauptsache auf Kosten der Hexosen des Nährmediums; Disaccharide, wie z. B. den Rohrzucker, vermag er nicht zum Aufbau zu verwenden, ebensowenig wie er sie zu vergären imstande ist, doch soll hiervon im folgenden Paragraphen näher die Rede sein. Der Umstand, daß die organischen, nicht-flüchtigen Säuren bei Kultur von Apiculatushefen in Obstsäften stark schwinden, in höherem Grade noch als z. B. bei *Sacch. ellipsoideus*, legt den Gedanken nahe, es möchten diese Säuren der in Rede stehenden Hefe auch als Kohlenstoffquelle zu ihrem Aufbau dienen können. Doch ist ebensogut möglich, daß in den beobachteten Fällen

die Wein- und Aepfelsäure weniger zu diesem Zwecke verwendet als vielmehr durch einen Gärprozeß zersetzt wurden. Hinsichtlich der Stickstoffassimilation unterscheiden sich die apiculaten Hefen nicht von den übrigen, wenigstens liegen keine Angaben hierüber vor.

5 Gegen schädliche Einflüsse scheint *Sacch. apiculatus* empfindlicher zu sein als die im Weine vorkommenden Rassen von *Sacch. ellipsoideus* und die Bierhefen. Schon auf S. 319 wurde die größere Empfindlichkeit gegen Alkohol erwähnt. Genügen schon wenige Prozent desselben, um das Wachstum zu hemmen, und, wie es scheint, wenig 10 mehr, um auch die Gärung zum Stillstand zu bringen, so ist offenbar ein beträchtlich höherer Alkoholgehalt erforderlich, um den Tod der Apiculatushefen herbeizuführen. Doch wird auch hier ein großer Unterschied zwischen den Rassen festzustellen sein. Aber abgesehen hiervon ist *Sacch. apiculatus* bedeutend empfindlicher als *Sacch. ellipsoideus*; in Truben eben 15 vergorener Weine sind dessen Zellen in der Regel tot. Daß ausnahmsweise vereinzelte Zellen von einer vielleicht kräftigeren Rasse unter Umständen recht ausdauernd sein können, läßt ein Befund von R. Braun (1) erkennen, wonach lebende Zellen von *Sacch. apiculatus* in einem Biere von nahezu 8 Proz. Alkohol noch nach mindestens 5 Jahren nachgewiesen 20 werden konnten. Bei seinem Forschen nach geeigneten Methoden, um eine reinere Gärung der Obst- und Traubenweine herbeizuführen, stellte Müller-Thurgau (3) auch fest, daß Apiculatushefen durch einen Gehalt der Moste an schwefliger Säure getötet werden, dem die elliptischen Weinhefen noch zu widerstehen vermögen. Sowohl Hansen (2) als auch 25 Kayser (1) bezeichnen *Sacch. apiculatus* als besonders empfindlich gegen das Austrocknen, doch scheinen nach Will (1) die verschiedenen Rassen sich hierin nicht ganz gleich zu verhalten (vergl. Bd. V, S. 112). A. Berlese (1) hält den Pilz sogar für sehr widerstandsfähig gegen die Sonnenstrahlen. Müller-Thurgau (4), der die Widerstandsfähigkeit 30 der Apiculatushefe gegen höhere Temperaturen prüfte, konnte auch hierin eine Verschiedenheit der Rassen feststellen. Eine darunter erwies sich als entschieden empfindlicher als alle anderen zum Vergleich herangezogenen, indem sie in Traubensaft bei 50° schon in 10 Minuten getötet wurde, während die übrigen in dieser Beziehung sich nur un- 35 wesentlich von den elliptischen Weinhefen unterschieden, indem sie 55° zehn Minuten lang ertrugen. Ob die Rassen von *Sacch. apiculatus* in der Abhängigkeit ihres Wachstums von der Wärme sich anders verhalten als die eigentlichen Weinhefen, wurde noch nicht untersucht, obschon eine solche Feststellung für die Gärungsleitung nicht ohne Be- 40 deutung wäre. Man vergl. auch S. 153 dieses Bandes.

§ 75. Die Gärungserscheinungen.

Die durch *Saccharomyces apiculatus* verursachte Gärung ist stets eine Untergärung; in Obst- und Traubensäften tritt sogar oft nur eine schwache Trübung ein, wohl wegen der im allgemeinen geringen Gärungs- 45 energie dieser Hefe und sodann, wie schon Reess (1) andeutet, wohl auch deshalb, weil ihre Zellen beim Mangel eigentlicher Sproßverbände den Kohlensäureblasen keinen gehörigen Angriffspunkt darbieten.

In den Gärungsvorgängen und dem sonstigen Stoffwechsel weisen die verschiedenen Stämme unter sich eine gewisse 50 Gleichartigkeit auf, während sie sich entschieden abweichend von den

eigentlichen Bier- und Weinhefen verhalten. Allerdings hat man in dieser Hinsicht bisher nur wenige der ersteren einer genaueren Untersuchung unterworfen. In einer mit Dextrose, also d-Glucose, versetzten Nährlösung führen die von HANSEN beschriebenen Stämme eine kräftige, aber nicht weit gehende Untergärung durch, die entstehende 5 Schaumdecke ist aus viel kleineren Blasen aufgebaut und erreicht nicht solche Mächtigkeit wie jene, die z. B. von *Sacch. cerevisiae* aufgeworfen wird. Das gleiche Verhalten gegen Dextrose ist für die AMTHOR'schen Stämme, wie auch für den von L. BOUTROUX (1) festgestellt worden. Die Lävulose oder d-Fructose ist den Befunden von M. CREMER (1) zu- 10 folge ebenfalls durch *Sacch. apiculatus* vergärbar. Das Gleiche gilt für die Mannose oder Seminose. Dagegen ist eine vierte Hexose, die d-Galactose, für diesen Sproßpilz unangreifbar, wie FR. VOIT (1) sowie E. FISCHER und H. THIERFELDER (1) übereinstimmend angeben. Soweit unsere Kenntnisse derzeit reichen, kann man sagen, daß kein 15 einziges der Disaccharide durch unseren Sproßpilz vergoren wird. Dies haben E. CHR. HANSEN für die Saccharose und Lactose, HANSEN und später auch AMTHOR (1) für die Maltose erwiesen. Demnach könnten durch den *Sacch. apiculatus* in Bierwürze nur geringe (aus deren Hexosen hervorgehende) Mengen von Alkohol erzeugt werden. 20

Da dieser Sproßpilz also wohl die Hexosen, nicht aber auch Disaccharide vergärt, so darf man schließen, daß er invertierende Enzyme, wie Invertin und Maltase, nicht hervorzubringen vermag, was für das Invertin auf dem Wege des Versuches durch HANSEN (1) bestätigt worden ist. Wenn man hingegen jene Disaccharide invertiert, z. B. 25 durch Erwärmen mit etwas Säure, dann sind sie auch diesem Pilze zugänglich und ebenso, wenn in der Nährflüssigkeit neben ihm noch ein invertinbildender Sproßpilz anwesend ist.

Aus dem oben geschilderten Verhalten des *Sacch. apiculatus* gegenüber den Zuckerarten für die Zwecke des analytischen Chemikers Nutzen 30 zu ziehen, hat K. AMTHOR (1) vorgeschlagen und zwar für jene Fälle, in denen geringe Mengen von Dextrose neben Disacchariden quantitativ zu bestimmen sind, so z. B. in der Bierwürze. Man solle eine gemessene Menge der zuvor aufgekochten Probe mit Apiculatushefe impfen. Diese verarbeite nur die Dextrose und man könne dann aus der Menge des 35 entstandenen Alkohols (oder der Kohlensäure) auf den Dextrosegehalt der Probe schließen. A. BAU (1), der eine neue genaue Vorschrift für dieses Verfahren gibt, verteidigt es in weiteren Arbeiten (2, 3, 4) gegen einige Bedenken, die von H. ELION (1) geäußert worden waren. Doch mußte er angesichts der Empfindlichkeit dieses Gärerregers gegen 40 Alkohol doch das Eine selbst zugestehen, daß man dieses Verfahrens nur dann sich bedienen könne, wenn der Dextrosegehalt der Probe gering ist, und daß man selbst in diesem Falle nicht gewiß sein könne, ob jene Menge vollständig vergäre. Allein selbst unter solcher Einschränkung ist das Verfahren für den praktisch tätigen Analytiker nicht 45 brauchbar, denn die Vergärung der Hexosen ist dabei sehr träge, wie man aus Angaben AMTHOR'S (2) entnehmen kann. Dieser beimpfte eine keimfreie Würze mit *Sacch. apiculatus* und fand darin nach 27 Tagen 0,66 Vol.-Proz., nach weiteren 54 Tagen 0,79 Proz., neun Monate später 1,2 Proz. und nach abermals neun, also im ganzen 21 Monaten 1,5 Vol.- 50 Proz. Alkohol. Selbst unter der nicht erwiesenen Voraussetzung, daß dann alle Hexose vergoren war, muß man dieses Verfahren als für praktische Zwecke zu langwierig bezeichnen. Dennoch sind die auf seine

Ausarbeitung verwendeten Mühen nicht ohne Nutzen geblieben, weil man damit auch auf physiologischer Grundlage eine Bestätigung des schon früher von einigen Chemikern, so von H. Bungener und L. Weibel (1) gemachten Befundes gewonnen hat, daß in der Bierwürze eine viel größere Menge von vergärbarem, von Maltose verschiedenem Zucker vorhanden ist, als man bis dahin angenommen hatte, vielleicht ein Viertel bis ein Drittel des Gesamt-Zuckers.

Auf Grund hier nicht näher zu schildernder Versuche kam E. Dubourg (1) zu der Ansicht, daß Hefen, die nicht imstande sind, gewisse Zuckerarten zu verwenden, durch Gewöhnung hierzu befähigt werden können. Einer Hefe, die z. B. den Rohrzucker nicht invertieren könne, sei man imstande, diese Fähigkeit zu verschaffen, indem man sie zuerst in einem Gemisch von Glucose und Rohrzucker züchte und dann in eine Saccharoselösung mit geeigneten Hefennährstoffen übertrage. Leider fehlt in der Abhandlung die nähere Bezeichnung der Hefen. Hierauf macht auch A. Klöcker (1) aufmerksam, der das von Dubourg vorgeschlagene Verfahren für einige in dieser Beziehung besonders charakteristische Hefen, darunter den uns hier interessierenden *Sacch. apiculatus*, nachprüfte (vergl. S. 158). Der Befund dieser Versuche war ein durchaus negativer; dieser letztere Sproßpilz war auch nach der vorgeschriebenen Behandlung nicht fähig, Saccharose zu vergären, vermochte also entgegen der Behauptung Dubourg's kein Invertin zu erzeugen.

Trotz der anfänglich raschen Vermehrung der Apiculatushefen in Trauben- und Obstsäften ist die von ihnen verursachte Gärung doch wenig ausgiebig, langsam verlaufend und erstreckt sich dafür in der Regel auf einen langen Zeitraum. Das erhellt u. a. aus den von Müller-Thurgau (2) beschriebenen Versuchsreihen. Bei 14° betrug die von Anfang der Gärung an abgegebene Kohlensäure pro Liter Traubensaft am 10. Tage 6.8 g, am 20. Tage 9.4 g, am 40. Tage 12.0 g, am 80. Tage 14.6 g, am 100. Tage 15.0 g, am 130. Tage 16.8 g und am 205. Tage 18.0 g. Die Rassen des *Sacch. apiculatus* sind also durchwegs gärschwache Hefen, wenn auch immerhin zwischen den verschiedenen Stämmen ziemlich große Unterschiede bestehen. Die endgültig erzeugte Alkoholmenge (vergl. S. 319) schwankt unter gewöhnlichen Gärungsbedingungen bei den bisher beschriebenen Rassen zwischen 2.5—4.5 Gew.-Proz. Alkohol. Unter den durch den Verfasser neuerdings gezüchteten Rassen brachten es zwei in Traubensaft sogar bis auf 6 Prozent. Selbstverständlich hängt die schließlich erzeugte Alkoholmenge nicht allein von der Hefenrasse sondern auch davon ab, ob die zu vergärende Flüssigkeit dem Sproßpilz mehr oder weniger günstige Lebensbedingungen bietet. Der endgültig erzielte Alkoholgehalt ist dementsprechend nach Versuchsergebnissen Müller-Thurgau's z. B. in Birnsaft und Traubensaft verschieden, auch wenn man sie mit der gleichen Hefe vergären läßt. Die Apiculatusrasse 8 z. B. lieferte in Traubensaft 2.83, in Birnsaft 3,5 Gew.-Proz. Alkohol. Es darf wohl angenommen werden, daß bei diesem Sproßpilze ähnlich wie bei den übrigen durch die Ernährungsverhältnisse und andere Lebensbedingungen nicht nur das Wachstum sondern auch die Tätigkeit der einzelnen Zellen beeinflußt wird. Schnellerer oder langsamerer Verlauf der Gärung sowie die verschiedene Höhe des Vergärungsgrades in ungleich beschaffenen Gärflüssigkeiten sind dann einerseits durch die Zahl der wirksamen Hefenzellen und andererseits durch die Gärwirkung der einzelnen Zellen bedingt. Nicht ausgeschlossen ist aber, daß unter Umständen nur der eine oder der

andere dieser beiden Faktoren zur Geltung gelangt. Methodisch durchgeführte Untersuchungen zur Entscheidung dieser Frage fehlen zur Zeit noch.

Daß durch Zufuhr von freiem Sauerstoff bezw. von Luft die Vermehrung der Apiculatushefen gefördert wird, hat bereits auf 5 S. 321 Erwähnung gefunden; es erübrigt hier nur noch, den Einfluß der Sauerstoffzufuhr auf den Gärvorgang selbst darzulegen. RÖHLING (1), der mit mehreren Rassen Versuche anstellte, hat namentlich festgestellt, daß bei Sauerstoffzufuhr die in Rede stehenden Hefen in auffällig hohem Grade gekräftigt werden und in Traubensaft beträchtlich höhere Alkohol- 10 mengen zu erzeugen vermögen. Ohne Sauerstoffzufuhr schwankten die endgültig erzielten Alkoholgehalte zwischen 2,27 und 3,03 Gew.-Proz., bei Sauerstoffzufuhr zwischen 5,01 und 5,76 Prozent. Da bei der Probe, in der dies Maximum erreicht wurde, nur noch ein Zuckerrest von 0,2 Proz. übrig blieb, so hätte die betreffende Hefe in einem zucker- 15 reicheren Traubensafte wohl noch etwas mehr Alkohol bilden können. Im Durchschnitt hat, wie diese Befunde zeigen, die Sauerstoffzufuhr die Alkoholbildung verdoppelt; Lebensenergie und Widerstandskraft der Hefe gegen Alkohol wurden also ganz bedeutend erhöht, in höherem Grade, als bei den elliptischen Weinhefen bis anhin beobachtet wurde. 20 Bei Sauerstoffzufuhr verläuft die Gärung vom ersten Tage an rascher und ist trotz des höheren schließlich erreichten Alkoholgehaltes früher beendigt als in der Gegenprobe ohne Sauerstoffzufuhr.

Gewisse chemische Substanzen, die bei der Weingärung in Betracht kommen, wie Essigsäure, schweflige Säure und Gerbstoff 25 (s. S. 135—138) hemmen das Wachstum der Apiculatushefen und vermindern wohl auch direkt ihre Gärungsenergie, ähnlich wie dies übrigens bei den Bier- und Weinhefen der Fall ist. Nach den von RÖHLING (1) mitgeteilten Versuchsergebnissen macht sich der Einfluß von 0,1 Proz. Essigsäure im Gärverlauf schon deutlich bemerkbar, bei 0,5 Proz. ist 30 die Gärung etwa auf ein Drittel der normalen eingeschränkt, und bei 1 Proz. wird sie so gut wie vollständig verhindert. Bei schwefliger Säure vermögen schon 0,025 Proz. die Gärungstätigkeit des *Sacch. apiculatus* fast ganz zu verhindern; nach den früheren Befunden MÜLLER-Thurgau's (3) genügen hierzu schon 65 mg im Liter, also 0,0065 Proz. 35 Bedeutend weniger energisch wirkt der Gerbstoff (Tannin), von dem erst bei einem Gehalt von 0,5 Proz. eine erhebliche Gärungshemmung ausgeübt wurde.

Bei der Vergärung von Obst- und Traubensäften durch Apiculatushefen werden auch deren nicht-flüchtige, sogen. fixe orga- 40 nische Säuren, also Wein- und Aepfelsäure, in den Stoffwechselprozeß gezogen (vergl. S. 94). Es wurde dies von MÜLLER-THURGAU (2) erwiesen, bei dessen Versuchen die angewandte Rasse den Gehalt an nicht-flüchtiger Säure in Traubensaft von 0,883 auf 0,669 Proz., also um etwa 24 Proz. des anfänglichen Gehalts, herabsetzte, in Birnsaft von 0,450 auf 0,265 Proz., 45 also um rund 40 Proz., verminderte. (In letzterem hatte sie auch mehr Alkohol gebildet.) In dem gleichen Trauben- und Obstsafte und unter den nämlichen Umständen verursachten einige zum Vergleich herangezogene elliptische Hefen geringere Säureabnahmen. Auch dann, wenn mit diesen Hefen *Sacch. apiculatus* zusammen wirkte, in sogen. Misch- 50 kulturen, machte sich dessen Fähigkeit, die Säure stärker anzugreifen, deutlich bemerkbar. Nun sind in Obst- und Traubensäften Säuren verschiedener Art vorhanden, und zudem wird ja bei der Gärung auch

Säure (Bernsteinsäure) gebildet. Jene Versuchsergebnisse können daher trotz ihres technischen Interesses das Verhalten unseres Sproßpilzes gegenüber Säuren nicht vollständig aufklären. Es ist dies eher von Versuchen mit Gärflüssigkeiten zu erwarten, die nur je eine organische Säure enthalten und überhaupt eine einfachere, chemisch bekannte Zusammensetzung besitzen. Schon Schukow (1) hat in einem einzelnen Versuche nachgewiesen, daß unser Sproßpilz in einer künstlich zusammengesetzten Nährlösung, die allerdings Wein- und Aepfelsäure zugleich enthielt, einen größeren Säureverbrauch zeigte als alle übrigen zum Vergleiche herangezogenen Wein- und Bierhefen. Weitere Untersuchungen in der angedeuteten Richtung werden hier noch wertvolle Resultate bringen. Eingehender wurde in letzter Zeit das Verhalten verschiedener Pilze gegenüber der Milchsäure durch Meissner (2) studiert und dabei auch der *Sacch. apiculatus* berücksichtigt. Allerdings wurden diese Versuche in künstlichen Lösungen angestellt, in denen es an vergärbarem Zucker fehlte, so daß möglicherweise das Verhalten der Organismen von dem in gärenden und überhaupt der Entwicklung günstigeren Flüssigkeiten abweicht. Während in der Mineralstoffe, Pepton und Milchsäure enthaltenden Lösung verschiedene Weinhefenarten 70 Proz. und mehr von der Milchsäure zersetzten, zeigte diese bei einer der Apiculatushefen, die sich allerdings nur wenig vermehrte, bloß eine Abnahme von 0,018 Proz. (d. i. 1,5 Proz. der vorhandenen Menge). Zwei andere Rassen vermochten überhaupt nicht in der Lösung zu wachsen. In vergorenem Weine war die Abnahme der Milchsäure durch eine Apiculatushefe geringer als im Durchschnitt bei den elliptischen Hefen, wohl deshalb, weil hier der Alkohol auf erstere stärker hemmend einwirkte.

Neben dem Säureverbrauch schreitet eine Säurebildung einher, an der unser Sproßpilz ebenfalls beteiligt sein kann. Sowohl nichtflüchtige als auch flüchtige Säuren können dabei entstehen. Unter den ersteren ist die Bernsteinsäure längst als Gärprodukt angeführt und wird wohl auch von *Sacch. apiculatus* gebildet. Für die beiden von ihm untersuchten Stämme hat Amthor den exakten Beweis geliefert, daß sie während der Gärung beträchtliche Mengen nicht-flüchtiger Säure lieferten, und zwar die eine Rasse 0,37 g pro 100 ccm (als Weinsäure), dreimal mehr als Pasteur bei Gärung mit gewöhnlicher Hefe fand. Dazu wäre erst noch diejenige Menge hinzuzurechnen, die infolge von Zersetzungsvorgängen verschwunden ist. Nun hat zwar Meissner gezeigt, daß *Sacch. apiculatus* auch Milchsäure zu erzeugen vermag, und zwar sowohl aus Bernsteinsäure als auch aus Aepfel- und Citronensäure, und in dieser Beziehung nur wenig hinter den Weinhefenrassen zurücksteht, allein da durch die Umwandlung der erwähnten organischen Säuren in Milchsäure nicht eine Zunahme, sondern eine Abnahme des Säuregrades der Flüssigkeit erfolgt, wird dadurch die von Amthor gefundene beträchtliche Zunahme an gesamter fixer Säure nicht erklärt. Will man nicht annehmen, daß jene neu gebildete Säure ausschließlich Bernsteinsäure sei, so gelangt man zu dem Schlusse, daß bei der Gärung durch Apiculatushefen auch nicht-flüchtige Säure anderer Art gebildet wird.

Die ausgesprochene Fähigkeit des *Sacch. apiculatus*, flüchtige Säure in größeren Mengen zu erzeugen, wurde schon auf S. 319 besprochen und daselbst auch von verschiedenen Versuchsanstellern erzielte Mengen erwähnt. Nach Ansicht von Müller-Thurgau (1) sind

diese flüchtigen Säuren für unseren Sproßpilz ein Kampfmittel, durch das er die anderen Hefen in der Entwicklung hemmt. Welcher Art diese flüchtige Säure ist, kann noch nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Sie besteht jedenfalls nur zum Teil aus Essigsäure, wie AMTHOR (1) durch Herstellung des Silbersalzes ermittelt hat. Demgemäß schmecken auch nach den Befunden MÜLLER-THURGAU'S (2) die Weine nicht stichig, wie es der Fall sein müßte, wenn die flüchtige Säure aus Essigsäure allein bestände. Bei Versuchen in einer aus Ammoniumsalzen, Dextrose und Invertzucker hergestellten sterilisierten Nährlösung, die mit *Sacch. apiculatus* geimpft wurde, fand AMTHOR (2) nach Ablauf der Gärung in dem Destillat neben Essigsäure auch Ameisensäure und eine geringe Menge einer bei 120—125° siedenden Säure. Von nicht-flüchtiger Säure konnte er dabei Bernsteinsäure und Milchsäure nachweisen. Jene ersteren treten wohl zum Teil mit dem Alkohol zu Estern zusammen, die bei der Kostprobe nicht sauer riechen und schmecken, bei der Destillation jedoch zerfallen, so daß die Säure zur Bestimmung gelangt. Diesen Estern nun, die unser Sproßpilz in erheblich größeren Mengen als andere Hefen erzeugt, ist in der Hauptsache der sogen. Fruchtgeschmack zu danken, welcher den von ihm vergorenen Mosten, Würzen und Fruchtsäften eigen ist. Nach den von W. SEIFERT (1) ausgeführten Untersuchungen erzeugte er unter sechs reingezüchteten Hefenarten in demselben Traubenmost (neben 0,064 Proz. flüchtiger Säure) die größte Menge flüchtiger Ester. Der Estergehalt, in ccm Zehntel-Normallauge auf 100 ccm Wein ausgedrückt, entsprach 10,8, während er bei den übrigen Hefenarten zwischen 1,32 und 4,4 schwankte. P. LINDNER (2) beobachtete eine intensive Fruchtätherbildung durch eine Apiculatushefe, namentlich bei reichlicher Durchlüftung der Gärflüssigkeit und Gegenwart genügend großer Dextrosemengen. Neben den wohlriechenden Estern werden von den Apiculatushefen unter Umständen wohl noch andere Geruchs- und Geschmacksstoffe gebildet. Auf die verschiedene Art der Geruchsstoffe ist von H. WILL (2) geradezu eine Sonderung der von ihm aus Würze, Bier, Trauben usf. rein gezüchteten Stämme gegründet worden: Die eine Schar ist durch einen schimmlig muffigen Geruch ihrer Zuchten gekennzeichnet, die andere weist ein sehr scharf hervortretendes, an Amyläther (Obstgeruch) erinnerndes Bouquet auf. In gezuckertem Hefenwasser wird von ihnen Essigäther hervorgebracht. Diese stark riechenden Aether entstehen insbesondere dann ziemlich reichlich, wenn man die Nährlösung anhaltend lüftet. Unter denjenigen Hefen, die in Wein Schwefelwasserstoff und damit den unangenehmen Böcksergeschmack in stärkerem Grade erzeugen können, führt SCHANDER (2) auch Rassen von *Sacch. apiculatus* an.

Als weitere Erscheinungen des Stoffwechsels möge nur noch kurz Erwähnung finden, daß, wie HENNEBERG (1) nachwies, die Zellen dieser Hefe nur in sehr geringem Grade die Fähigkeit besitzen, Glycogen aufzuspeichern. Die schon auf S. 318 erwähnte rasche Verflüssigung der Gelatine in Kulturen der verschiedenen Apiculatushefen weist andererseits auf eine ausgiebige Erzeugung proteolytischer Enzyme hin. Als besondere Eigenart dieser Sproßpilze wird endlich von AMTHOR (1) hervorgehoben, daß der mit ihnen zur Gärung angesetzte Traubenmost stark entfärbt werde, eine Beobachtung, die SCHANDER (1) für die von ihm untersuchten Rassen bestätigen konnte.

§ 76. Bedeutung des Saccharomyces apiculatus für die Weinbereitung.

Als regelmäßiger Bestandteil der reichen Pilzflora auf reifen Weintrauben und Obstfrüchten wurde dieser Sproß-
5 pilz von Reess (1) nachgewiesen, und dieser Befund ist seitdem von Pasteur (1) und einer Reihe anderer Forscher bestätigt worden. Von woher und wie unser Sproßpilz auf die Trauben gelangt, hat Hansen (1) in seinen grundlegenden Untersuchungen über den Kreislauf der Hefen dargetan, wozu gerade der *Sacch. apiculatus* wegen der charakteristischen
10 Gestalt seiner Zellen, woran er jederzeit wieder zu erkennen, sich besonders eignete. Im § 32 dieses Bandes findet sich eine Zusammenfassung dieser Befunde, an welche unsere weitere Darstellung sich anschließen kann. Auf unreifen Früchten findet man Zellen von *Sacch. apiculatus* nur ausnahmsweise; sie gehen hier infolge ungünstiger Verhältnisse, zumal wegen
15 der Trockenheit, rasch zugrunde. Werden aber die Früchte reifer, so gestalten sich auch die Existenzbedingungen für unseren Sproßpilz günstiger. Auf den Kirschen, welche ja von allen (mitteleuropäischen) Obstfrüchten zuerst reifen, beginnt er; bald darauf findet er sich auf den Stachel- und Johannisbeeren, dann auf den Zwetschen und zuletzt
20 auf den Weintrauben. Die Erdbeeren, die Himbeeren, die Vogelbeeren u. a. reihen sich entsprechend ein. Von zwei Fruchtarten mit verschiedener Reifezeit, also z. B. Johannisbeeren und Weintrauben, weisen selbst in dem Falle, als beide nebeneinander ihren Standort haben, zuerst nur die frühreifen jenen Pilz auf, während er hingegen auf der
25 anderen Art zu dieser Zeit noch ganz fehlt oder doch nur vereinzelt vorkommt. So fand Müller-Thurgau (5) in einem Weinberge zu Geisenheim am Rhein an einer Stelle, wo eine Anlage von frühreifen Frühburgunderreben an eine solche von Spätburgundern grenzte, am 23. August auf den gerade reif gewordenen Trauben der ersten Sorte reichlich
30 Hefe, während die unmittelbar benachbarten (aber noch nicht reifen) Spätburgunder davon noch frei waren. Abgesehen davon, daß die vereinzelten, durch den Wind auf die reifen Trauben getragenen Hefenzellen daselbst günstigere Lebensbedingungen finden und zudem, wenn ihnen durch irgend eine Oeffnung Saft zugänglich wird, sich stark ver-
35 mehren können, trägt zu jenem Verhältnis ohne Zweifel der von Müller-Thurgau hervorgehobene Umstand bei, daß die Insekten mit Vorliebe reife Früchte absuchen und bei dieser Gelegenheit z. B. Hefen von verletzten Beeren auf die Haut von noch gesunden reifen übertragen, hier vielfach aber selbst wieder Verletzungen verursachen und diese gleich-
40 zeitig infizieren. Während hierbei mehr an eine Uebertragung der Sproßpilze durch die Beine, die Mundwerkzeuge und den behaarten Körper der Insekten gedacht war, wies A. Berlese (1) nach, daß die Hefen und speziell der *Sacch. apiculatus* im Darmkanal verschiedener Insekten sich nicht nur erhalten, sondern sogar stark vermehren und
45 dann mit den Exkrementen auf die Früchte übertragen werden; ja er sieht hierin gerade ein Hauptverbreitungsmittel unseres Sproßpilzes.

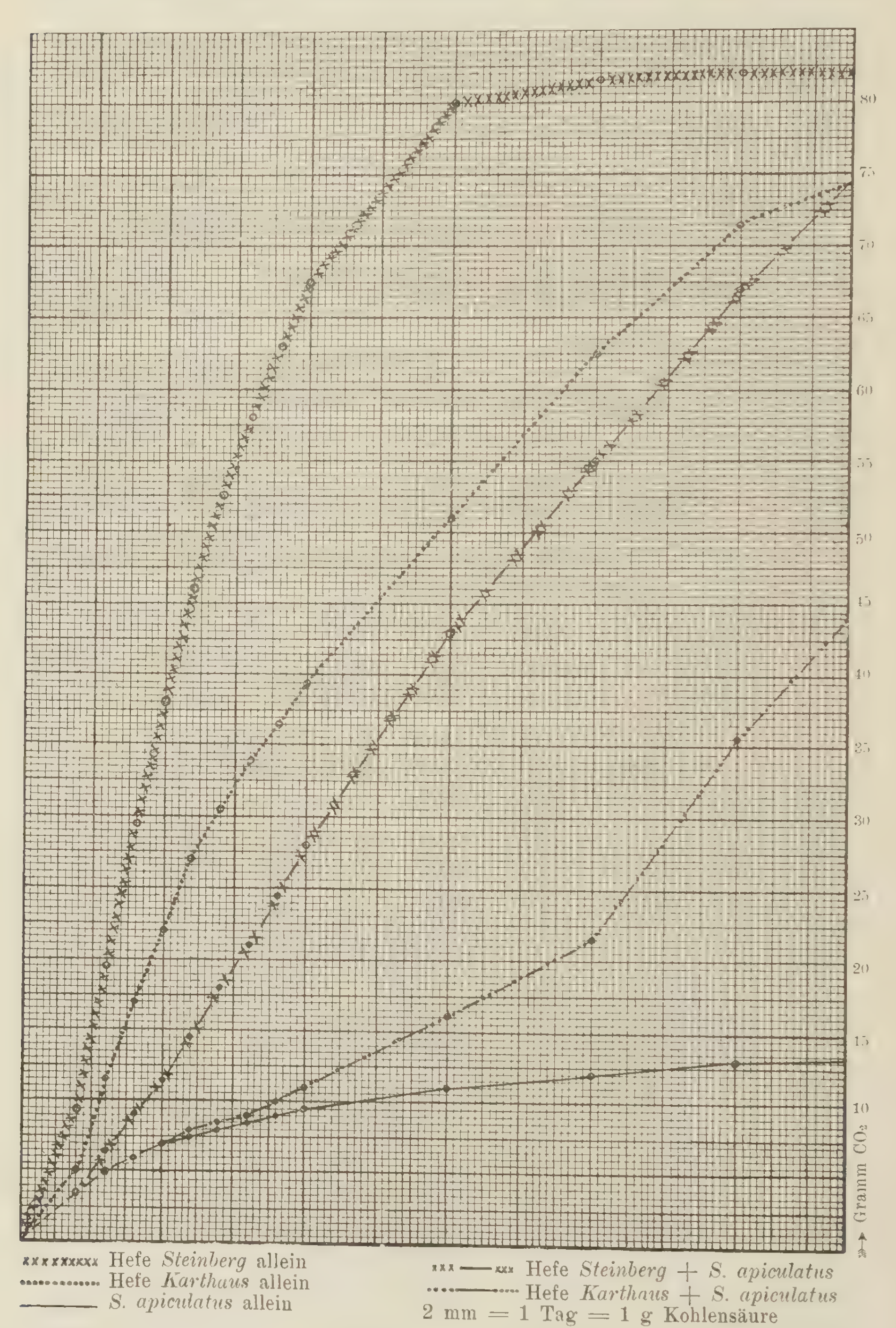
Sehr verschieden ist nun das Zahlenverhältnis, in dem sich die verschiedenen Organismen auf den reifen Früchten und hernach im abgepreßten Safte vorfinden. Da aber hiervon ganz wesentlich der Verlauf
50 der Gärung sowie auch die Beschaffenheit des Gärproduktes abhängt, so sollten die Umstände, welche dieses Verhältnis bestimmen, näher

untersucht werden. So wäre es bei dem großen Einfluß, den die Apiculatushefen ausüben, erwünscht zu wissen, welche Faktoren es bewirken, daß in einem Jahre relativ viel, in anderen weniger Zellen dieses Sproßpilzes sich auf den zur Weinbereitung benutzten Früchten befinden, warum das Verhältnis zwischen elliptischen und apiculaten Hefen je 5 nach den äußeren Verhältnissen bald günstig, bald ungünstig ist. Zurzeit wissen wir jedoch hierüber nur wenig.

Reess, der das häufige Vorkommen des *Sacch. apiculatus* auf Trauben feststellte, kam bei seinen Versuchen zu dem Ergebnis, daß in vielen Fällen dieser Sproßpilz die anfängliche Leitung der Hauptgärung im 10 Weine übernimmt, die dann wenig später von dem nun lebhafter wachsenden *Sacch. ellipsoideus* übernommen und zu Ende geführt wird. Auf einer größeren Zahl aus verschiedenen Gegenden stammender Trauben haben Martinand und Rietsch (1) die Pilzflora untersucht. In einem Falle fand sich auf acht Traubensorten nur *Sacch. apiculatus*, 15 auf drei anderen 20 Proz. *Sacch. ellipsoideus* und 80 Proz. *Sacch. apiculatus* und *Mycoderma*. Als diese Forscher in einem anderen Falle zerdrückte Trauben der Gärung überließen, fanden sie nur Schimmelpilze und *Sacch. apiculatus*; erst wiederholte Versuche ergaben einige Kolonien von *Sacch. ellipsoideus*. Aus Markobrunner Trauben gewonnene Flüssig- 20 keiten enthielten 80 Proz. *Sacch. apiculatus*, solche aus Johannisberger Trauben 25 Proz., andere weniger, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß bei weiteren Transporten die Pilzflora auf den zusammengepackten Trauben sich in der Zusammensetzung ändern kann. Nach Befunden Müller-Thurgau's (1) bei der Untersuchung frischer Trauben 25 ergab sich aber ebenfalls das oft massenhafte Vorkommen von Apiculatushefen neben einer geringen Zahl elliptischer Hefen. So fanden sich auf der Oberfläche von Trauben aus Bernegg im Rheintal und aus Winterthur keine anderen Hefen als *Sacch. apiculatus*, während auf Trauben aus einem Weinberge von Brestenberg (Aargau) 93 Proz. der Hefen- 30 zellen *Sacch. apiculatus* angehörten. In manchen anderen Fällen war allerdings das Verhältnis für *Sacch. ellipsoideus* günstiger. Obige Angaben beziehen sich auf die Vorkommnisse auf einzelnen Beeren oder Trauben; es kann aber selbstverständlich die Pilzflora auf Trauben an benachbarten, ja sogar an denselben Weinstöcken verschieden beschaffen 35 sein. So ist denn bisher auch kein Beispiel bekannt gegeben worden, daß ein Traubenmost nur unvollkommen vergären konnte, weil bloß Apiculatushefen anwesend waren. Wohl dagegen tritt dieser Fall gelegentlich bei Johannisbeerwein ein; warum aber hier eher als dort, kann zurzeit nicht gesagt werden. Auch bei der Gärung der Aepfel- 40 und Birnmoste ist häufig im Anfange wenigstens ein starkes Vorwiegen unseres Sproßpilzes festzustellen, öfters noch als bei den Traubenmosten.

Den **Einfluß** des *Sacch. apiculatus* auf die **Weingärung** bei gleichzeitiger Anwesenheit von *Sacch. ellipsoideus*, also bei sogen. **Mischsaaten**, hat Müller-Thurgau (1 u. 2) genauer studiert. Es wurden 45 dabei in Gärflaschen, enthaltend gleiche Mengen eines zuvor sterilisierten weißen Weinmostes, verschiedene Weinhefen ausgesät und zwar in der einen Reihe für sich allein, in der anderen hingegen zusammen mit dem *Sacch. apiculatus*. Es kam in jedem Falle eine annähernd gleich große Zahl von Zellen jeder Hefenart zur Verwendung, so daß die mit einer 50 Weinhefe samt der zugespitzten Hefe beimpften Flaschen doppelt so viele Zellen enthielten wie jene anderen, denen man nur Weinhefe oder die Apiculatushefe allein zugesetzt hatte. Durch tägliche Wägung der

Fig. 96. Einfluß des *Saccharomyces apiculatus* auf die Gärtätigkeit zweier Weinhefen.



×××××××× Hefe *Steinberg* allein
•••••••••• Hefe *Karthaus* allein
———— *S. apiculatus* allein

××× —— ××× Hefe *Steinberg* + *S. apiculatus*
•••—————••• Hefe *Karthaus* + *S. apiculatus*
2 mm = 1 Tag = 1 g Kohlensäure

Flaschen wurde die Kohlensäureabgabe und so der Gärverlauf bestimmt. Von zweien der verwendeten Weinhefen ist wenigstens der erste Teil des so ermittelten Gärverlaufes im Bilde dargestellt worden (s. *Fig. 96*). Die Abscissen drücken die Dauer der Gärung in Tagen aus, die Ordinaten hingegen zeigen die Gesamtmenge von Kohlensäure (in g pro Liter Gärflüssigkeit) an, die bis zu den betreffenden Tagen entbunden, d. h. durch die Wage bestimmt worden sind. Die aus Kreuzchen zusammengesetzte Linie zeigt den Gärverlauf der Probe mit *Steinberg 1*, einer kräftigen Rheingauer Weißweinhefe allein, die aus Punkten zusammengesetzte Linie den einer gärschwachen Rotweinhefe aus Karthaus bei Ittingen im Kant. Thurgau und die voll ausgezogene Linie endlich den Gärverlauf in der mit *Sacch. apiculatus 3* allein beimpften Probe. Die kleinen Kreise entsprechen den bestimmten Daten der Kohlensäureentwicklung. Das Weitere ist aus der Tafel selbst zu entnehmen, so insbesondere der Unterschied zwischen dem Gärverlauf der beiden Weinhefen für sich, wie auch die erhebliche Beeinträchtigung ihrer Gärungstätigkeit durch die Apiculatushefe. Selbst eine so kräftige Hefe wie die *Steinberg 1* wurde durch die zugespitzte Hefe anfangs erheblich gehemmt, so daß z. B. am 10. Tage die gesamte Kohlensäureabgabe betrug: bei *Steinberg* 38.1 g, bei *Apiculatus* 6,8 g und in der Probe mit beiden Hefen nur 11.6 g, trotzdem hier ja die Hefenaussaat doppelt so groß war. In demselben Maße, wie der Alkoholgehalt der Gärflüssigkeit steigt, wird aber die Apiculatushefe geschwächt und damit ihr schädigender Einfluß auf die Weinhefe vermindert. Es ist dies aus der Figur deutlich zu erkennen. In noch höherem Maße als die Hefe *Steinberg* wird die schwächere Rotweinhefe *Karthaus* von der Apiculatushefe beeinträchtigt, und es tritt dieser Einfluß bei der in der Figur gewählten Darstellung hier auch noch deutlicher hervor. Am 20. Tage betrug die Menge der bis dahin abgegebenen Kohlensäure bei *Karthaus* allein 39.6 g, bei *Apiculatus* 9.4 g und da, wo beide Hefen zusammenwirkten, 10.8 g. Die Weinhefe ist also bis dahin kaum zur Wirkung gelangt. Aber von jetzt an, wo ca. 1 Gew.-Proz. Alkohol vorhanden ist, und in noch höherem Grade vom 40. Tage an, wo der Alkoholgehalt ca. 2 Proz. erreicht, steigt die Gärung rasch. Die Weinhefe vermag sich nun dem Einfluß der durch den Alkohol geschwächten Apiculatushefe zu entziehen.

Die Frage, auf welche Weise die Apiculatushefe die Gärungstätigkeit der elliptischen Weinhefen zu hemmen vermag, ist noch nicht endgültig beantwortet. Wie Müller-Thurgau (1 u. 2) nachgewiesen hat, wird sowohl in Obst-, als in Traubenmost, wo unser als Schädling erkannter Sproßpilz mit einer Weinhefe zusammenarbeitet, weniger Hefe gebildet, als wo letztere allein wirkt. Es ist aber anzunehmen, daß jener nicht allein das Wachstum sondern auch die Gärtätigkeit der einzelnen Zellen hemmt, sei es durch Verminderung der Gärungsenergie der Zellen oder durch Abkürzung ihrer Wirkungsdauer, oder in beiden Richtungen.

Das Mittel, durch das die anderen Hefen gehemmt werden, dürfte in erster Linie die flüchtige Säure sein. Allerdings ist, wie Müller-Thurgau (1) hervorhebt, deren Menge nicht so bedeutend, daß ihr, wenigstens als Essigsäure, eine so beträchtliche Wirkung zukäme; allein zum Teil besteht sie ja auch aus der wirksameren Ameisensäure, und wahrscheinlich werden auch noch andere wachstums- und gärungshemmende Stoffe gebildet. Wird durch den entstehenden Alkohol der Gärungsvorgang des *Sacch. apiculatus* gehindert, dann hört auch die

Neubildung jener gärungshemmenden Substanzen auf; die schon vorhandenen werden aber, wie man aus dem Gärungsverlauf schließen kann, entweder zerstört oder in weniger wirksame übergeführt, die flüchtigen Säuren z. B. in Ester.

Je kräftiger eine elliptische Weinhefe ist, desto weniger wird sie, wie die angeführten Versuche beweisen, von der Apiculatushefe gehemmt, einmal weil sie überhaupt widerstandsfähiger gegen schädliche Einflüsse ist und sodann, weil sie rascher eine gewisse, den Schädling zurückhaltende Alkoholmenge zu erzeugen vermag. Aus letzterem Grunde wird denn auch ein in größerer Menge zugesetzter *Sacch. ellipsoideus* neben *Sacch. apiculatus* rascher die schwierige Periode des Kampfes überwunden haben als eine schwache Aussaat. Versuche, die Röhling (1) nach dieser Richtung hin anstellte, ergaben in der Tat, daß bei starker Aussaat elliptischer neben wenig apiculater Hefe letztere weniger zur Geltung gelangt, die Gärung ist fast gar nicht gehemmt; dagegen macht sich immerhin eine wenn auch etwas geringere Mehrbildung von flüchtiger Säure bemerkbar. Auch bei der Kostprobe erwiesen sich diejenigen Weine besser, bei denen im Anfang die Anzahl der elliptischen Hefen gegenüber den apiculaten in starkem Vorsprung war.

Die Mitwirkung des *Sacch. apiculatus* bei der Weingärung bleibt auf alle Fälle von Nachteil, und zwar nicht nur deshalb, weil die Gärung langsamer verläuft, die fixen Säuren in einer nicht regulierbaren, bei gewissen säurearmen Getränken zu weit gehenden Weise zerstört werden, weil ferner flüchtige Säuren und andere unangenehm riechende und schmeckende oder doch den Charakter des Getränkes verändernde Verbindungen, Ester etc., entstehen, sondern weil auch der Vergärungsgrad in vielen Fällen nicht ein befriedigender ist. Nach den Befunden Müller-Thurgau's (2) enthalten nämlich sowohl Traubenweine als auch Obstweine, die mit einer elliptischen Weinhefe und einer Apiculatusrasse vergoren sind, meist einen größeren Rest unvergorenen Zuckers als solche, bei deren Gärung die letztere Hefe nicht mitwirkte. So betrug z. B. in dem auf S. 329 erwähnten Versuch dieser Zuckerrest in einem Traubenweine nach abgeschlossener Hauptgärung bei *Sacch. apic.* 10,0 Proz., bei *Steinberg* 0,05 Proz., bei *Steinberg* und *Sacch. apic.* 0,075 Proz., bei *Karthaus* 0,189 Proz., bei *Karthaus* und *Sacch. apic.* 0,396 Proz. Es ist aber bekannt, daß Weine mit nicht hohem Alkoholgehalt mehr zu Krankheiten, wie Essigstich und namentlich dem Zähwerden, neigen, wenn sie noch einen merklichen Rest von Zucker enthalten, der den betreffenden Krankheitserregern als Nahrung oder Gärmaterial dienen kann.

Die Bereitung der Trauben- und Obstweine ist nun in der üblen Lage, daß sie sich mit dem *Sacch. apiculatus* abfinden muß. Bei Aepfeln und Birnen läßt sich durch Waschen allerdings ein großer Teil der Eigenhefe entfernen; beim Beerenobst und vor allem bei den Trauben ist ein solches Vorgehen aber aus mehr als einem Grunde nicht gut tunlich. Eine Reinigung des Traubenmostes durch Filtrieren oder Centrifugieren stößt auf bis jetzt unüberwindliche Schwierigkeiten, und auch das Pasteurisieren ist bei den heute waltenden Verhältnissen des Weinbaubetriebes meist undurchführbar. Dagegen bietet die immer mehr überhandnehmende Anwendung der reingezüchteten Weinhefen ein geeignetes Mittel, den in der Eigenhefe sich vorfindenden *Sacch. apiculatus* möglichst rasch unschädlich zu machen. Wenn wie beim Beerenobst ein starkes Vorwalten des Schädlings vorausgesehen werden kann,

ferner wenn bei Weintrauben oder dem frisch abgepreßten Traubensaft eine mikroskopische Untersuchung einen solchen Befund ergibt, ist es angebracht, eine größere als die übliche Zugabe von Reinhefe anzuwenden und diese so früh als möglich zuzusetzen. Bei der Herstellung von Apfel- und Birnweinen wird man Getränke von reinerer Gärung 5 und geringerem Gehalte an flüchtiger Säure erhalten, wenn man die Früchte vor dem Mahlen gründlich wäscht und dem Safte dann ebenfalls eine genügende Menge einer kräftig wirkenden Reinhefe zusetzt. Bei alledem bleibt dem *Sacch. apiculatus* immer noch während des Mostens und zu Anfang der Gärung etwas Gelegenheit, um wenigstens eine 10 kurze Zeit hindurch sein Unwesen zu treiben. Um auch dies zu vermeiden, empfiehlt es sich, wenigstens in gewissen Fällen, nach dem Vorschlage Müller-Thurgau's (3) eine reinere Gärung dadurch zu erzielen, daß man in den Mosten die empfindlicheren Pilze, darunter die Apiculatushefe, durch schweflige Säure vernichtet und die Gärung hierauf ver- 15 mittelst einer recht kräftigen, eventuell noch an dieses Gift gewöhnten guten Weinhefenrasse in Gärung setzt: Näheres darüber im 17. Kapitel des V. Bandes. Einer Angabe Nathan's (1) zufolge ist es ihm gelungen, durch einen anfänglichen Zusatz von 2 Proz. Alkohol in Beerensäften die zugespitzte Hefe am Aufkommen zu verhindern. Noch besser be- 20 währte es sich, wenn nach dem Abpressen sofort 10—15 Proz. vergorener Trauben- oder Beerenwein zugesetzt wurde. Eine weitere Berücksichtigung scheint dieser Vorschlag jedoch nicht gefunden zu haben.

Nicht immer erhalten, wenigstens bei den Obstweinen, die reingärigen Getränke bei den Genießenden den Vorzug. Manche lieben die 25 stärker auf Geruch und Geschmack einwirkenden, von Apiculatushefen erzeugten Fruchtäther und Ester, zumal in sonst bouquetarmen Getränken, und es sind vielleicht in der Literatur vorfindliche widersprechende Urteile über den Einfluß unseres Sproßpilzes auf den Geschmack der Obstweine hierdurch zu erklären. Daß unter starker Mitwirkung von Api- 30 culatushefe vergorene Weine bei der Untersuchung hohe Werte für flüchtige Säure ergeben können, ohne eigentlich als stichig beanstandet werden zu dürfen, wird für die Lebensmittelchemiker von Interesse sein.

Ueber das Vorkommen des *Sacch. apiculatus* im Brauereibetriebe vergleiche man S. 235 u. f. des V. Bandes. 35

Literatur

zum Kapitel Saccharomyces apiculatus.

*__Amthor,__ Karl, (1) Z. f. physiolog. Chemie, 1888, Bd. 12, S. 558. — (2) Chem.-Ztg., 1891, S. 670. *__Bau,__ Arminius, (1) W. f. Brauerei, 1890, Bd. 7, S. 1069. — (2) Ebenda, 1891, Bd. 8, S. 1. — (3) Ebenda, S. 592. — (4) Ebenda, 1892, Bd. 9, S. 1421. *__Beijerinck,__ M. W., (1) Centralbl. f. Bakt., 1894, Bd. 16, S. 49 u. 52. *__Berlese,__ A., (1) Rivista di patologia vegetale. I.—III. Abhandlg., 1897, Bd. 7; ref. in Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1897, Bd. 3, S. 592. *__Boutroux,__ L., (1) Ann. d. sciences natur., Bot., 6. sér., 1884, Bd. 17, S. 144. *__Braun,__ Richard, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1902, Bd. 25, S. 409. *__Bungener,__ H., und __Weibel,__ L., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1891, Bd. 14, S. 75. *__Cremer,__ Max, (1) Z. f. Biologie, 1894, Bd. 31, S. 183. *__Dubourg,__ E., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1899, Bd. 128, S. 440. *__Elion,__ H., (1) Centralbl. f. Bakt., 1891, Bd. 9, S. 525. *__Engel,__ (1) Les ferments alcooliques. Thèse. Paris 1872, S. 52. *__Fischer,__ Emil, und __Thierfelder,__ H., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1894, Bd. 27, S. 2031. *__Hansen,__ E. Chr., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1881, Bd. 1, S. 159. — (2) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1905, Bd. 14, S. 547. *__Henneberg,__ W., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1902, Bd. 25, S. 553. *__Kayser,__ E., (1) Ann. Pasteur, 1890, Bd. 4, S. 321. *__Klöcker,__ A., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1900, Bd. 5, S. 58. *__Lindner,__ P., (1) W. f. Brauerei, 1903, Bd. 20, S. 505. — (2) Ebenda, 1896, Bd. 23, S. 552. — (3)

Jahrbuch der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin, 1904, Bd. 7, S. 448. — (4) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1895, Bd. 1, S. 782. *Martinand, V., und Rietsch, M., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1891, Bd. 62, S. 763. *Meissner, Richard, (1) Anleitung z. mikroskop. Untersuchung u. Reinzüchtung d. häufigsten im Most u. Wein vorkommenden Pilze. Stuttgart 1891, S. 41. — (2) 2. Bericht der Kgl. Weinbau-Versuchsanstalt Weinsberg f. d. Jahr 1904, S. 53 u. 69. *Müller-Thurgau, H., (1) 5. Jahresber. d. Schweiz. Versuchsanstalt in Wädenswil für 1894/95, S. 76; Weinbau und Weinhandel, 1897, Nr. 17. — (2) 7. Jahresber. etc. für 1896/97, S. 50. — (3) Ebenda, S. 56, und 9. Jahresber. etc. für 1898/99, S. 74. — (4) Die Herstellung unvergorener u. alkoholfreier Obst- u. Traubenweine. 3. Aufl., Frauenfeld 1896. — (5) Ber. ü. d. Verhandl. d. 11. Deutsch. Weinbaukongresses in Trier 1889, S. 88. *Nathan, L., (1) Fortschritte auf d. Gebiete der Fruchtweinbereitung. Stuttgart 1893; ref. in Kochs Jahresb., 1893, Bd. 4, S. 160. *Pasteur, L., (1) Études s. l. bière. Paris 1876, S. 148. *Reess, Max, (1) Botan. Untersuchungen ü. d. Alkoholgärungspilze. Leipzig 1870. *Röhling, A., (1) Morphol. u. physiol. Untersuchungen ü. einige Rassen d. Sacch. apic. Dissert., Erlangen 1905. *Schander, R., (1) Bericht d. Kgl. Lehranstalt zu Geisenheim f. d. Jahr 1903/04, S. 123. — (2) Jahresber. d. Vereinig. d. Vertreter d. angew. Bot., 2. Jahrg., 1903/04, S. 92. *Schukow, J., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1896, Bd. 2, S. 611. *Seifert, W., (1) Z. f. Nahrungsmittel-Unters. etc., 1893, Bd. 7, S. 148. *Voit, Fritz, (1) Z. f. Biologie, 1893, Bd. 29, S. 147. *Will, H., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1896, Bd. 19, S. 453. — (2) Ebenda, S. 675.

(*Manuskript-Einlauf:*
6. August 1906.)

16. Kapitel.

Die Monilien und Oidien.

Von Dr. H. Wichmann.

§ 77. Monilia, Sachsia und Chalara.

Von jenen Pilzen, welche als *Fungi imperfecti* (s. Bd. I, S. 214) zusammengefaßt werden, erregen das besondere Interesse des Gärungstechnikers die *Monilia* genannten Arten. Wir verstehen unter diesem Namen Pilze, die morphologisch zwischen Schimmel- und Sproßpilzen 5 stehen, gleichsam einen Uebergang bildend.

Den Monilien fehlt in erster Linie ein so vollkommenes Mycelium, wie wir es sonst bei Schimmelpilzen, z. B. bei *Penicillium*, sehen, und wenn auch gefächerte und verzweigte Hyphen nicht selten auftreten, so ist doch das Gefüge des Mycels ein recht lockeres. Es zerfallen daher 10 auch die Hautbildungen, welche von einigen Arten bei Zuchten auf Flüssigkeiten hervorgebracht werden, sehr leicht; sie haben mehr den Charakter von Kahmhäuten. Dagegen sind andererseits die Sproßmycelien, die gewöhnliche Wuchsform der Monilien, von einem so reichen Polymorphismus, wie wir ihn auch bei echten Sproßpilzen nie 15 finden. Gerade hierin liegt das Eigentümliche der Gattung *Monilia*. In einem solchen Sproßmycel kommen, besonders wenn es alt ist, meist alle Formelemente des Sproßpilzkreises von der kugeligen, an *Torula* erinnernden Zelle bis zur langgestreckten Zelle, wie sie *Mycoderma* zeigt, ja sogar Schlauchzellen von auffallender Länge vor; daneben 20 durchsetzen aber auch Zellen, die denen des *Oidium* gleichen, und gefächerte Hyphen von typischem Bau die Pilzmasse. Solche Sproßmycelien entwickeln sich nicht nur in Nährflüssigkeiten, sondern sie stellen auch das normale Wachstum auf festen, feuchten Nährböden dar, wes-

halb auch z. B. die Riesenkolonien auf Würzegelatine nicht Schimmelkolonien sondern Hefenkolonien täuschend ähnlich sehen. Regel ist es auch, daß die Vegetationen derselben Art auf verschiedenen Nährböden so große Verschiedenheit der Zellform zeigen, daß man sie nicht zur selben Art rechnen würde.

Ein weiteres, zusammen mit der Vielgestaltigkeit für die Gattung *Monilia* diagnostischen Wert besitzendes Merkmal ist das Fehlen charakteristischer Fruktifikationsorgane. Bei den meisten Arten kann man überhaupt von Fruktifikation nicht sprechen, und auch bei den wenigen, welche, wie *Monilia sitophila*, Konidienträgern ähnliche Hyphen über den Nährboden hinaustreiben, ist der Unterschied zwischen vegetativen Zellen und Vermehrungszellen ein sehr geringer, auf die Form beschränkter. So sind bei *Monilia sitophila* die Konidien und die mycelialen Zellen gleichmäßig orangegelb gefärbt. Bei einigen Arten, z. B. bei *Monilia variabilis*, nehmen wir an Schlauch- oder Oidiumzellen ausnahmsweise kleine, unregelmäßig verteilte Höckerchen oder Spitzen wahr, auf welchen die hefenzellähnlichen Konidien gesessen sind, und die man als Sterigmen deuten könnte; das ist aber auch alles. Wir haben also bei *Monilia* höchstens vegetative Hefenkonidien (vergl. Bd. I, S. 172 u. 192), die sich weder in der Form noch im Inhalte, noch durch den Ursprung von den Zellen des Sproßmyceliums wesentlich unterscheiden.

Wenn wir sprossende Zellen eines Saccharomyceten und einer *Monilia* nebeneinander vergleichen, so bemerken wir nicht unschwer einen auffälligen Unterschied im Aussehen des protoplasmatischen Inhalts: dieser ist bei *Monilia* zarter, homogen, die Zelle erscheint dadurch lichter, und die stets vorhandenen großen Vakuolen führen ein länglich rundes, lebhaft tanzendes Körnchen. Diese Vakuolenkörperchen sind nach Al. Guilliermond (1) identisch mit den metachromatischen Körnern von Babes oder den roten Körnern Bütschli's und haben Aehnlichkeit mit den Chromatinkörnern der Bakterien. Ein Zellkern ist, wie ja in den meisten Zellen, nicht sichtbar, jedoch nach Hansen und Guilliermond vorhanden.

In betreff der systematischen Stellung der Monilien sei auf Seite 215 des Ersten Bandes verwiesen. Jene Monilien, welche als parasitische Pilze auf verschiedenen Blütenpflanzen leben und als Erreger von Krankheiten des Kern- und Steinobstes schädlich werden, unterscheiden sich in mancher Hinsicht von den gärungserregenden Monilien, und seitdem es gelungen ist, bei den beiden wichtigsten Arten dieser Schädlinge (*Mon. fructigena* und *Mon. cinerea*) Apothecien nachzuweisen, wurden sie zur Gattung *Sclerotinia* gestellt; vergl. darüber Bd. V, S. 41 u. f.

Monilia candida (Bonorden) Hansen zeigt die typischen Moniliawuchsformen am schönsten. E. Chr. Hansen (1) hat diesen Pilz eingehend studiert und ihn mit einer von Bonorden (1) beschriebenen Art identifiziert. Der Formenkreis dieser Art ist sehr groß. Auf süßen Früchten oder frischem Kuhmist tritt sie in zarten Fäden mycelartig auf, während in zuckerhaltigen flüssigen und auf festen Nährböden ein den Hefen ähnliches Wachstum vorherrscht (vergl. Bd. I, S. 174, Fig. 33). Letzteres sehen wir am schönsten in gehopfter Bierwürze; die kugeligen bis ellipsoidischen Zellen zeigen lebhafte Sprossung, so daß, ähnlich wie bei Oberhefe, kleine Sproßverbände entstehen, welche bereits jene charakteristischen Langsprosse enthalten, die dem geübteren Beobachter sofort auffallen. Diese Zellformen finden sich vornehmlich im Bodensatze,

während die sich rasch bildende Haut wohl anfangs aus den gleichen Zellen, später aber aus einer schimmelähnlichen Vegetation mit langgestreckten, gefächerten Hyphen besteht, welche teils reichlich Hefen-
5 konidien abgliedern, teils oidienartig zerfallen; das Mycelium der Haut besteht demnach aus einem wirren Gemenge von echten Hyphen, Sproßverbänden, Sproßzellen und Oidienzellen. Auf festem Nährboden, wie z. B. auf Würzegelatine, auf welcher hefenähnliche Kolonien mit faltigwulstiger Mitte und flachem, faserigem Rande gebildet werden, finden sich die hefenzellähnlichen Wuchsgestalten im mittleren, die mycelartige
10 Ausbildung im randlichen Teile der Kolonie. *Monilia candida* zeichnet sich durch starkes enzymatisches Vermögen aus und galt lange Zeit als Beispiel für einen Pilz, welcher Saccharose direkt, d. h. ohne Beihilfe eines invertierenden Enzyms, zu vergären imstande sei, bis durch EMIL FISCHER und P. LINDNER (1) sowie ED. BUCHNER und
15 J. MEISENHEIMER (1) ein invertierendes Endoenzym, die Monilia-Invertase, nachgewiesen wurde (s. auch Bd. I, S. 272). Die Alkoholgärung ist am kräftigsten in Glucoselösungen, am schwächsten in Saccharose; in gehopfter Bierwürze wurden nach ungefähr 14 Tagen 1 Vol.-Proz., nach 26 Monaten 6,7 Vol.-Proz. Alkohol gebildet. Reine Maltose
20 wird sehr leicht, in einer Hefenwasserlösung vollkommen, vergoren, und da auch echtes Dextrin zerlegt wird, welches die Bierhefe nicht mehr zu spalten vermag, so erklärt sich die Beobachtung ARM. BAU's (1), daß Bierwürze durch *Monilia candida* weiter, wenn auch langsamer, vergoren werden kann als durch Bierhefe. Die Gärung ist von der Bil-
25 dung flüchtiger Nebenprodukte begleitet, welche gärungshemmend wirken. Die Gärung in Traubenmost lieferte 6 Vol.-Proz. Alkohol (gegen 14 Vol.-Proz. durch echte Weinhefe) nach ungefähr 3 Wochen, und der Monilia-Wein hatte einen auffälligen, eigentümlich fruchtartigen Geschmack, wie E. MACH und K. PORTELE (1) berichten. Die Gärtemperatur ist
30 verhältnismäßig recht hoch, Maximum bei 40° C. Das Maximum für die vegetativen Vorgänge liegt bei 42—43° C, das Minimum bei 6—4° C, so daß dieser Pilz also höhere Temperaturen zu lieben scheint. Als Stoffwechselprodukte wären nach HANSEN noch Säure (Milchsäure?) zu erwähnen und Nitrit, welches A. MAASSEN (1) in eben noch
35 nachweisbarer Menge fand. Diese Pilzart ist weit verbreitet: W. BRÄUTIGAM (1) traf sie als den häufigsten Sproßpilz in Schlempe und Biertrebern an, ferner im Miste der mit Schlempe gefütterten Rinder. Wohl werden aber auch häufig ähnliche Formen unter dem Namen *Monilia candida* aufgeführt, auch wenn sie nicht vollständig in allen Merkmalen
40 übereinstimmen; so beschreibt L. ADAMETZ (1) diese Art aus der Ackerkrume, MARPMANN (1) berichtet über ihr Vorkommen im Käse, ebenso HARZ (1) im Allgäuer Käse, aber auch auf Heu, getrockneten Zwetschken und Kranzfeigen. Nach ADERHOLD (1) findet sie sich beim Einsäuern der Gurken. Nebenbei wären noch Vorkommen, wie das von BEHRENS (1)
45 bei der Vorgärung des Tabaks bemerkte, zu erwähnen. Der Vollständigkeit halber sei noch hinzugefügt, daß B. FISCHER und BREBECK (1) bei *Monilia candida* eine „endogene Zellbildung" beobachtet haben und diesen Pilz zur Gattung *Endoblastoderma (Blastoderma*, s. S. 297) ihres Systems stellen wollten, was aber nach den kritischen Bemer-
50 kungen von LINDAU und von LINDNER nicht aufrecht zu erhalten ist.

Monilia variabilis LINDNER ist eine durch großen Polymorphismus ausgezeichnete Art, welche P. LINDNER (1) auf Berliner Weißbrot als grauweiße, mehlartige Flecke fand, die an Beläge von *Oidium lactis* er-

innerten, aber meist aus torulaähnlichen Zellen bestanden. Diese bilden kleinere oder größere Häufchen zwischen langen, fast leeren, zylindrischen Zellen, die an verschiedenen Stellen kleine Höckerchen tragen, an denen hier und da noch torulaähnliche Konidien sitzen. Letztere, mit einem Durchmesser von 1,8—4 μ, schwellen in Bierwürze, bevor sie auskeimen, bis zu 8 μ Durchmesser und darüber an und entwickeln gewöhnlich einen verzweigten Sproßverband ellipsoidischer Zellen. Die Endzellen wachsen häufig fädig aus, teilen sich und zerfallen oidiumartig in Teilstücke. Bemerkenswert ist, daß diese Fäden in der Tröpfchenzucht an die Oberfläche des Tröpfchens wachsen und torulaähnliche Konidien in die Luft abgliedern („Luftzellen"). Diese bedecken oft die oidiumähnlichen Zellen vollständig (s. *Fig. 97*). Die Hautzellen in Oberflächenzuchten sind überhaupt vorherrschend torulaähnlich, während bei Luftabschluß hefenzell- und dematiumähnliche Zellen gebildet werden. Diese *Monilia* führt uns also in ihren verschiedenen Entwicklungsstufen alle Formen des Sproßpilzkreises vor: Dematium-Formen, Oidium-Formen, Saccharomyces-Formen und Torula-Formen; so konnten in einem gegebenen Falle die zufällig beigemengten Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* nicht von den Zellen der *Monilia* unterschieden werden. Auf Bierwürze bildet *Monilia variabilis* sehr bald eine trockene, lockere, leicht zerfallende, m e h l a r t i g e D e c k e, welche mit der Zeit eine bedeutende Stärke, bis zu 1 cm, und auch größere Festigkeit erlangt, vorwiegend aus torulaähnlichen Zellen, doch auch aus langen, oidiumartigen Verbänden besteht und nach unten in die Flüssigkeit zottige Fortsätze treibt. Auf der Oberfläche beobachtet man mitunter Lufthyphen. Gleichzeitig bildet sich ein mächtiger Bodensatz aus, welcher, wie schon erwähnt, vorherrschend aus hefenzellähnlichen Wuchsgestalten in allen Größen und Formen besteht. Die Abimpfungen von Haut und Bodensatz in Bierwürze zeigen so starke Verschiedenheit, daß wir sie für Kulturen verschiedener Organismen halten würden, und es bleiben diese Variationen durch einige Generationen hin konstant. Mit Rücksicht auf ihr physiologisches Verhalten gehört *Monilia variabilis* zu den Gärungsmonilien. Glucose, Fructose, Galactose, Trehalose, Saccharose, Maltose, Lactose (zweifelhaft), Raffinose und Dextrin werden vergoren, während Mannose, die von *Monilia candida* angegriffen wird, unvergärbar

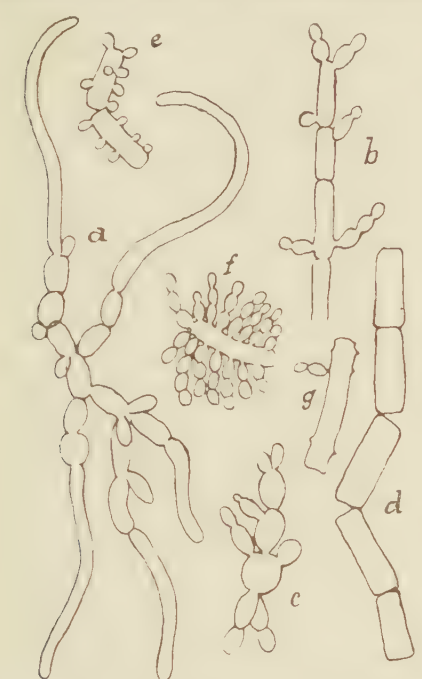


Fig. 97. Monilia variabilis.
a Jugendliches Sproßmycel, die Endzellen schlauchförmig verlängert; *b* älterer Faden mit Hefenkonidien; *c* hefenähnliches Sproßmycel; *d* oidienartiger Zerfall einer älteren Hyphe; *e* Oidien mit torulaähnlichen Konidien; *f* ebenso, die Konidien sprossend — „Luftzellen"; *g* Oidie nach dem Abwerfen der Konidien „Basidien"ähnliche Höcker zeigend.
Vergr. 600. Nach LINDNER.

ist. Vergärbar sind aber auch α-Methylglucosid und β-Methylglucosid, welch letzteres nach den Angaben von LINDNER (2) nur noch von *Sachsia suaveolens* (s. S. 341) vergoren wird. HEINZE und COHN (1) führen *Monilia variabilis* als echten Lactosevergärer an. Die Alkoholbildung ist 5 allerdings nicht bedeutend; nach 5 Monaten waren in Bierwürze nur 1,4 Gew.-Proz. entstanden.

Trotz ihres ausgedehnten Gärvermögens besitzen die eben beschriebenen Monilien keine technische Bedeutung, wogegen die beiden nächsten in den Lebensmittelgewerben Ostasiens Verwendung finden.

10 *Monilia javanica* wurde von F. A. WENT und PRINSEN-GEERLIGS (1) ein Pilz genannt, der sich im „Ragi" (s. 13. Kap. d. V. Bds.) neben anderen Pilzen findet. Er bildet dichte Fadenmassen mit dazwischen gelagerten, meist kugeligen Zellen, den sogen. Hefenkonidien, und zeigt auf festen, künstlichen Nährböden, z. B. Agar oder Klebreis, in den 15 Randpartien der Kolonien septierte Fäden, weshalb ihn die Entdecker für den sterilen Zustand eines höheren Pilzes hielten, was aber auch nicht durch die Untersuchungen neuerer Zeit sichergestellt werden konnte. Diese Art gedeiht sehr gut in zuckerhaltigen Nährflüssigkeiten, auf welchen zuerst eine Kahmhaut entsteht und dann erst Alkohol ge-20 bildet wird, was auf eine sehr schwach einsetzende Gärtätigkeit hindeutet. Vergoren werden Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose und Raffinose, dagegen nicht Lactose. Der gebildete Alkohol, im Maximum 5 Proz., hat infolge flüchtiger Gärungsprodukte keinen angenehmen Geruch und Geschmack, so daß dieser Pilz nur Arrak von minderer Qua-25 lität liefert. Als Nährstoffe dienen auch Dextrin und Glycerin; ersteres wird wahrscheinlich auch etwas vergoren.

Monilia sitophila (MONT.) SACCARDO dient nach WENT (1) den Eingeborenen in West-Java zur Herstellung eines Ontjom genannten Leckerbissens, welcher aus den Samen der Erdnuß (*Arachis hypogaea*) 30 besteht. Die durch und durch verpilzten Erdnüsse stellen kleine, orangegelbe Kuchen dar, welche oberflächlich von den Konidien bedeckt, innerlich aber durch das Mycel sowohl chemisch verändert als auch in ihrem Gefüge gelockert sind. Der Pilz bildet im Innern fester Nährböden und in Nährflüssigkeiten ein reich verzweigtes, aus gefächerten Hyphen 35 bestehendes Mycel, während die über die Oberfläche des Nährbodens sich erhebenden Hyphen an kurzen Aesten reichlich Konidien abgliedern. Die eiförmigen bis zylindrischen, 5—14 μ messenden Konidien entstehen derart, daß Aeste der (von WENT als Konidienträger aufgefaßten) Lufthyphen zahlreiche Querwände bilden, worauf sich die einzelnen 40 Zellen abrunden und loszulösen beginnen. Gleichzeitig findet aber eine weitere Vermehrung durch Sprossung der Konidien statt, so daß verzweigte Ketten und Gruppen von Konidien zustande kommen (s. *Fig.* 98). Die Trennung der Konidien voneinander erfolgt in einer eigentümlichen Weise, welche einigermaßen an die Isthmus-Bildung bei Penicillien er-45 innert. Die Konidien und derjenige Teil des Mycels, welcher mit der Luft in direkter Berührung ist, zeigen eine hell orangegelbe Färbung, die von einem dem Carotin ähnlichen Farbstoffe (vergl. S. 299) herrührt. Er ist meist in Form kaum sichtbarer feiner Tröpfchen im Protoplasma verteilt, sammelt sich aber bisweilen zu wahrnehmbaren größeren 50 Kügelchen. Nebst der Konidienbildung beobachtete WENT noch die Entstehung kleiner brauner Gebilde, welche jungen Perithecien glichen, aber nicht zur vollständigen Entwicklung gebracht werden konnten. Sie beginnen mit einer schraubig gewundenen Hyphe, welche sich reich-

lich verzweigt und zu einem dichten Hyphenknäuel wird. Die Ernährungsbedingungen der *Monilia sitophila* sind von Went (2) sehr eingehend studiert worden, worüber schon im Ersten Bande öfter die Rede gewesen ist. Dieser Pilz ist ungemein reich an Enzymen, es fehlt ihm keines der wichtigen, ja er besitzt mehrere der seltensten, so daß er ganz richtig als omnivor bezeichnet wurde; er vermag sogar auf Filtrierpapier zu gedeihen. Auch gegen die allgemeine Reaktion des Nährbodens ist er fast unempfindlich, und nur ein sehr hoher Säuregrad (10 ccm Zehntelnormal-Schwefelsäure auf 100 ccm Nährlösung) verhindert seine Entwicklung; aber auch hohe Alkalimengen waren ohne durchgreifenden Einfluß. Auch bei Luftabschluß kommt diese Art zu kräftiger Entwicklung, und nur bei vollständiger Verdrängung des Sauerstoffs ist das Wachstum ein spärliches. In anaerober Zucht, aber auch bei Luftzutritt, wird in geringer Menge Alkohol gebildet. Auffällig ist das reichliche Auftreten von Estern, welche auch dann entstehen, wenn Eiweiß als alleiniger Nährstoff geboten wird. Went fand diesen Pilz freilebend auf den Blattscheiden des Zuckerrohrs in Java und Saccardo in Weizenmehl und auf Brotteig zu Lyon. Er weicht morphologisch von den anderen Gärungsmonilien nicht unwesentlich ab und nähert sich im Bau des Mycels und durch die auf die Lufthyphen beschränkte Konidienbildung den parasitischen Monilien (*Sclerotinia fructigena* und *Scl. cinerea*). Bei der technischen Verwendung des Pilzes kommen nach Went in der Hauptsache die enzymatischen Wirkungen in Betracht: die Pilzfäden bohren sich in die Zellwände der Arachissamen ein, lockern den Verband der Zellen, so daß sie durch leichten Druck auseinanderfallen, die Eiweißkörper der Samen werden peptonisiert, das Oel wird gespalten, die allerdings nur in geringer Menge vorhandene Stärke wird verzuckert, und schließlich ist auch der Esterbildung einige Bedeutung beizumessen.

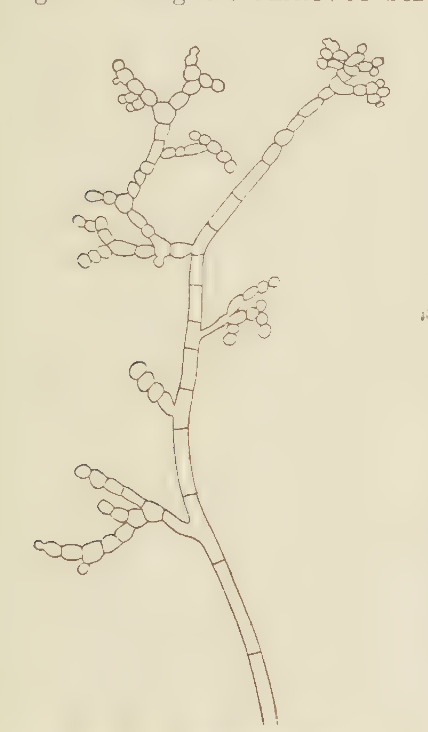


Fig. 98. Monilia sitophila.
Lufthyphe (Konidienträger mit sprossenden Hefenkonidien. — Vergr. 220.
Nach Went.

Monilia albicans (Robin) Zopf (1), der pathogene Soorpilz, welcher auch unter den Synonymen *Oidium albicans* Robin und *Saccharomyces albicans* Reess beschrieben wird, zeigt morphologisch völlige Uebereinstimmung mit *Monilia candida*. Als Unterscheidungsmerkmal könnten vielleicht die von Grawitz beobachteten gemmenähnlichen Bildungen herangezogen werden, wie auch das ganz unbedeutende Gärvermögen; erst nach sehr langer Zeit werden Spuren von Alkohol gebildet. Dieser Pilz ruft die sogen. Schwämmchenkrankheit auf der Schleimhaut

des Mundes, des Rachens und Schlundes von Säuglingen, aber auch von jungen Hunden und Katzen hervor, sowie die Soorkrankheit der Hühner, an welchen Krankheiten wahrscheinlich auch noch andere Pilze Schuld tragen. In der Natur findet sich der Soorpilz auf toten, verwesenden 5 Pflanzenteilen, besonders auf Mist u. dergl., ziemlich häufig vor.

Sowohl die Gärungsmonilien als auch die pathogenen Monilien sind weit verbreitet, und so finden sich in der technisch-mykologischen Literatur zahlreiche Angaben, die sich auf solche den beschriebenen Arten ähnliche Formen beziehen. Die große Aehnlichkeit der morphologischen Verhält-10 nisse machen oft eine genaue Unterscheidung schwer, wie ja meist aus den Beschreibungen, welche wichtige morphologische und physiologische Eigenschaften unberücksichtigt lassen, die Identität mit schon bekannten Arten selten klar zu entnehmen ist. Viele Monilien mögen andererseits von einzelnen Autoren als Kugelhefen, Kahmhefen oder Schimmelpilze u. ä. 15 bezeichnet worden sein. Meist als *Monilia* kurzweg benannte Formen wurden in Wein, in Käsen, in chinesischer Hefe, als Begleiter der Fäulnis verschiedener Früchte, in fetthaltigen Kraftfuttermitteln (s. 21. Kap. d. II. Bds.) gefunden. —

Sachsia albicans Bay wurde von J. Chr. Bay (1) ein zufällig auf-20 gefundener Pilz genannt, der auf der Oberfläche fester und flüssiger Nährböden ein schneeweißes Mycel entwickelt, welches reichlich mycodermaähnliche Zellen abschnürt. 25 Untergetaucht gestaltet sich das Sproßmycel mehr dematium- oder moniliaartig, und die abgegliederten Sproßzellen sind hefenzellähnlich, 30 kugelig, ellipsoid oder birnförmig (s. *Fig. 99, a, b*). Morphologisch zeigt diese Art die größte Aehnlichkeit mit einer *Monilia*, doch 35 bildet das Fehlen der alkoholischen Gärung einen auch von Bay betonten Unterschied.

Sachsia suaveolens, der 40 von P. Lindner (2) beschriebene Weinbouquetschimmel, wurde auf den Gärbottichen einer Brennerei gefunden. Sie bildet 45 auf Würzegelatine ein blendend weißes Luftmycel, in Würze große Flocken aus reichlich sprossenden Fäden, die sehr leicht in 50 die einzelnen Zellen zerfallen (s. *Fig. 99, c, d*); schließlich ist fast die ganze Würze von Pilzmasse

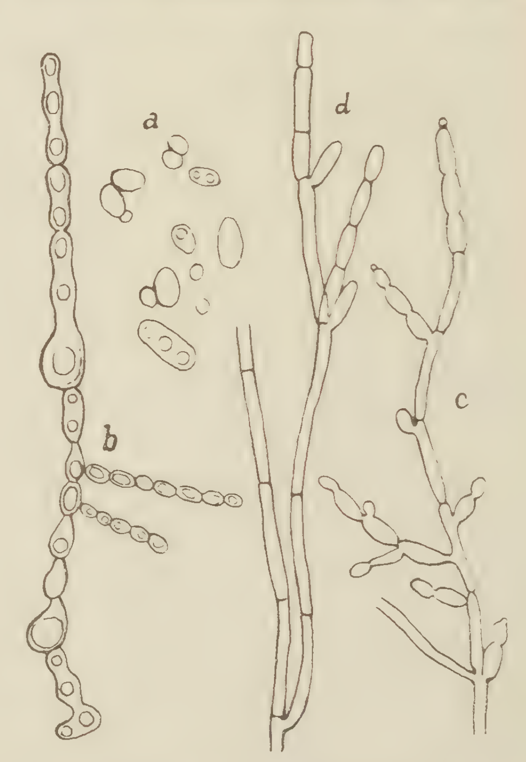


Fig. 99. *Sachsia albicans* und *Sachsia suaveolens*. *a* sprossende Zellen (Vergr. 775), *b* normales Mycelium (Vergr. 325) von *Sachsia albicans*; *c* Mycelfäden sprossend und *d* gefächert von *Sachsia suaveolens*. (Vergr. 300). *a* und *b* nach Bay, *c* und *d* nach Lindner.

erfüllt. Dabei tritt bei höherer Temperatur alkoholische Gärung ein, welche nach längerer Zeit zu einer sehr hohen Endvergärung führt. Während der Gärung entsteht ein wohlriechender, an Moselwein erinnernder Bouquetstoff. Der Geschmack der vergorenen Flüssigkeit, in der auch ziemlich viel Säure gebildet 5 wird, ist zu stark aromatisch um angenehm zu sein. Diese Art vergärt Glucose, Mannose, Galactose, Fructose, Saccharose, Lactose, Maltose und Dextrin, sowie Raffinose und β-Methylglucosid; in einigen Zuckerlösungen wurden auch Schleimmassen beobachtet. In älteren Zuchten findet man vereinzelt grünlich gefärbte Mycelfäden, deren Zellen reichlich mit 10 Fetttröpfchen erfüllt sind. Die Fähigkeit der Bouquetbildung wird zur Darstellung eines alkoholfreien Getränkes benutzt, auf welche MIRSCH und EBERHARD (1) ein Patent erhalten haben. Sowohl durch die Ausbildung der vegetativen Teile als auch durch sein Gärvermögen steht dieser Pilz den Monilien sehr nahe. — 15

Chalara Mycoderma, ein zuerst durch BONORDEN (1) gegebener Name, ist durch L. CIENKOWSKI (1) dann jenem Pilze beigelegt worden, den er in der Kahmhaut auf organischen Flüssigkeiten (Wein, Milch, Obstsäfte, Sauerkrautbrühe u. dergl. m.) oft gefunden und genauer beschrieben hat. Diese Art, die später auch durch E. CHR. HANSEN (3) aufgefunden und 20 abgebildet worden ist, soll im Anschluß an die Monilien erwähnt werden, weil die von ihr auf Nährflüssigkeiten entwickelte Kahmhaut ähnlich der von *Monilia candida* ist. Das vielfach verzweigte Mycel jenes Pilzes besteht aber aus sparrigen Langsprossen, welche meist dort, wo die Zellen zusammenstoßen, kugelige bis ellipsoidische Konidien abschnüren. 25 Manchmal stehen diese ca. 4—6 μ messenden Konidien an kurzen Stielen, wie an Sterigmen. Sie kommen auch an einzelnen Zellen zur Ausbildung, in welche häufig das Mycel oidiumartig zerfällt. Dadurch, daß sie mit Protoplasma dicht erfüllt sind und deshalb stark glänzen, heben sie sich von den zarten, fast leer erscheinenden Langzellen ab, so daß *Chalara* 30 ein charakteristisches mikroskopisches Bild liefert.

§ 78. Oidium lactis und Verwandte.

Die systematische Mykologie gliedert das weit verbreitete *Oidium lactis*, den Hauptvertreter der ganzen Sippe, den Basidiomyceten an. Maßgebend hierfür ist das Vorkommen jener eigenartigen Formen von 35 vegetativen Fortpflanzungszellen, welche als Oidien (s. Bd. I, S. 215 u. f.) bezeichnet werden. Sie haben ihren Namen von demjenigen Pilze, bei welchem sie zuerst in schönster Ausbildung getroffen wurden: das ist eben *Oidium lactis*. Ueber ihre Gestalt, Entstehung und Bedeutung war schon auf S. 195 des Ersten Bandes einiges gesagt worden, dem noch 40 die Bemerkung zugefügt sei, daß der rechteckige Umriß dieser Konidien ein so auffälliger ist, daß eine *Oidium*-Zelle kaum mit einem anderen Zelltypus verwechselt werden kann. Insoweit es bisher nicht gelungen ist, neben der Oidiumfruktifikation auch die zweite, typische Basidiomyceten-Fruktifikation aufzufinden, mögen solche *Oidium*-Arten noch bei den *Fungi* 45 *imperfecti* abgehandelt werden, um so mehr, als sie durch mancherlei Uebergänge mit den übrigen Arten dieser Sammelgruppe verbunden sind. Ebenso halten wir an der guten alten Bezeichnung *Oidium* fest und wollen diesen so trefflich charakterisierenden Namen schon aus Zweckmäßigkeitsgründen beibehalten, weil „*Oidium*“ nicht bloß in dem vor- 50

liegenden Handbuche sondern in der gesamten Gärungsliteratur ein allgemein bekannter Gattungsname ist, und weil es bei der unsicheren Stellung dieser Pilzgattung im Systeme doch nur von geringem Werte wäre, den vorgeschlagenen neuen Ausdruck „*Oospora*“ einzuführen (vergl. Bd. I, S. 215—216).

Die Arten der Gattung *Oidium* sind durch ein typisches Mycel charakterisiert, das aus gefächerten, unregelmäßig verzweigten Hyphen besteht, welche meist an den Enden, aber auch in der Mitte, in kurz-zylindrische Zellen von fast rechteckigem, nur an den Ecken etwas abgerundetem Umriß zerfallen. Sprossung kommt im Bereiche dieser Gattung nur ausnahmsweise vor.

Oidium lactis Fresenius, dieser in der Natur und in den Betrieben der Gärungsgewerbe weit verbreitete Pilz, wird gewöhnlich als Milchschimmel bezeichnet, da er fast stets auf saurer Milch angetroffen wird, wie er sich ja vornehmlich im Bereiche der Molkerei auf der Oberfläche unreiner Geräte, auf Käse usw. findet; in Butter ist er so regelmäßig und häufig, daß Laser (1) sein Vorkommen als biologischen Nachweis von Butter verwenden wollte. Gewöhnliche Fundorte sind unter anderen die Oberfläche der Preßhefen-Pakete, saure Gurken, die käufliche Stärke, Grünmalz, sowie im Bereiche der Brauerei die Trubsäcke und die hölzernen Bottiche und Lagerfässer (als weißlicher Anflug), ferner Abwässer, der Mist von Haustieren usw.

Insoweit der Pilz mit freiem Auge sichtbar ist, stellt er einen weißen, zarten, feinfädigen Anflug oder Flaum, manchmal einen mehlartig trockenen und selten einen gelblichen, schleimigen Ueberzug dar, während er in künstlichen Zuchten auf den mannigfaltigsten Nährböden stets den gleichen schneeweißen, dickfilzigen, pelzartigen Belag bildet. Ganz dasselbe Aussehen besitzen die Decken auf Nährflüssigkeiten, so daß eine *Oidium*-Zucht schon auf den ersten Blick als solche erkannt werden kann. Alte Zuchten stellen hier und da aufrecht stehende Hyphenmassen dar, welche an Basidiomyceten erinnern. Aehnliche Gebilde beschreibt Lindner (2), welche dadurch zustande kommen, daß in Riesenkolonien das Hautplectenchym vollkommen gasdicht wird und daher von der (bei der Gärung entstehenden) Kohlensäure kugelig aufgetrieben wird; letztere kann eben auch seitlich nicht entweichen, da die Kolonie am Rande fest auf dem Nährboden aufsitzt.

Das Mycelium in der oft mächtigen Pilzmasse besteht aus gefächerten, höchst unregelmäßig verzweigten Hyphen, deren Glieder anfänglich ziemlich lang sind (s. *Fig. 100*). Im jugendlichen Mycel, insbesonders aber beim Auskeimen der Konidien, sind die Zellen schlauchförmig, und erst nachträglich tritt reichliche Querwandbildung ein. Von den so entstehenden kurz-zylindrischen Zellen sind die Konidien kaum verschieden. Diese zeigen die typische Gestalt der Oidie. Sie entstehen in vollkommenster Weise so, daß sich eine Hyphe über das Substrat erhebt und nach Beendigung des Spitzenwachstums durch Querwände in kurze Zellen teilt. Bald trennen sich dann die einzelnen Zellen, ohne sich erheblich abzurunden, voneinander ab, was, wie Lindner beobachtete, meist ruckweise unter Zuckungen des ganzen Fadens geschieht. Sehr häufig, fast regelmäßig, ist die Trennung insoferne eine unvollständige, als zwei oder auch mehrere Oidien noch an einer Ecke zusammenhängen und so im Zickzack gebrochene Ketten bilden. Ein solcher im Zerfall begriffener Faden ist ungemein charakteristisch; aber auch noch im Verbande geben die Oidienketten durch die Gleichmäßigkeit in

Form und Größe ihrer Glieder ein auffälliges Bild. Nach der Trennung behalten die Konidien noch längere Zeit ihren rechteckigen Umriß bei und runden sich erst vor dem Auskeimen ab. Sind solche vereinzelte Oidien mit Hefenzellen vermengt, z. B. bei Preßhefe, so unterscheidet man sie von diesen außerordentlich leicht, sowohl durch die Form — die Längswände sind vollkommen parallel — als auch durch den Inhalt, welcher ein kräftigeres Relief zeigt und von zahlreichen Vakuolen und Körnern durchsetzt ist. Die Konidien entstehen aber nicht bloß an eigenen Hyphen — dies ist sogar der seltenere Fall — sondern es gehen namentlich auf sehr feuchten Nährböden auch mittlere Stücke der Hyphe in Oidien über, ja nicht selten zerfällt das ganze Mycel in seine einzelnen Zellen. Dieses Verhalten bringt *Oidium lactis* und seine Verwandten wieder in nähere Beziehung zu den Monilien. An jugendlichen Mycelien, die bei reichlichem Luftzutritt in wenig Wasser gebracht worden sind, tritt sehr schön jene eigenartige Zellbildung auf, die als „Durchwachsung“ oder auch „innere Konidienbildung“ bezeichnet wird (vergl. Bd. I, S. 170 u. 194).

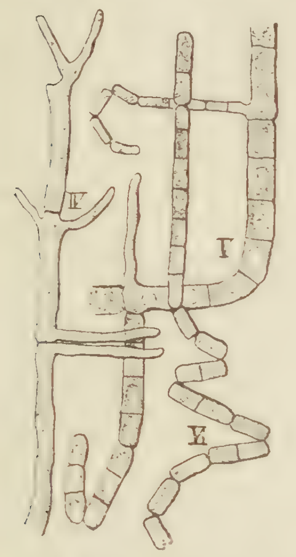


Fig. 100. Oidium lactis. *IV* Hyphe mit reichlicher Bildung von Seitenästen; *V* ein verästelter Faden in Teilung begriffen; *VI* Zerfall in die Oidien unter Zickzack-Krümmung der Kette. — Vergr. 600. Nach LINDNER.

Ueber die Physiologie des *Oidium lactis* wurden schon an verschiedenen Stellen dieses Handbuches einzelne Bemerkungen gemacht, die hier kurz zusammengefaßt werden sollen. Obwohl *Oidium*, im Gegensatze zur *Monilia*, enzymarm genannt werden muß, so beobachten wir doch eine nicht unbedeutende Gärtätigkeit, welche sich durch eine starke Gasentwicklung äußert. Dabei wird aber nur wenig Alkohol gebildet: nach HANSEN (2) in Bierwürze und Glucose-Hefenwasser nur Spuren, nach WEIDENBAUM (1) in 2 Wochen 0,6 Proz., nach BREFELD 1,2 Proz. in 3 Monaten, während LANG und FREUDENREICH (1) schon nach 10 Tagen 0,55 Vol.-Proz., nach 5 Wochen 1,0 Proz. fanden und feststellten, daß in Glucose- und Lactose-Lösungen die Gärung kräftiger vor sich geht als in Saccharose- oder Maltose-Lösungen. Invertase konnte nicht isoliert werden. Milchsäure (s. Bd. III, S. 100) wird durch diesen Pilz oxydiert, so daß die Acidität der sauren Milch sinkt. Auf proteolytische Enzyme deutet schon die Verflüssigung der Gelatine, welche besonders leicht bei saurer Reaktion derselben eintritt, hin, was von WEIDENBAUM als diagnostischer Unterschied gegenüber *Oidium (Monilia) albicans* aufgefaßt wird. Ferner teilen LANG und FREUDENREICH mit, daß in Milchzucker-Maltose-Peptonbouillon starker Geruch nach (Limburger) Weichkäse auftrat, und daß in steriler Milch eine weitgehende (wahrscheinlich vollständige) Zersetzung des Caseins erfolgte. Auf diese kräftige Einwirkung auf Eiweißkörper ist vielleicht auch die Beobachtung HENNEBERG's zurückzuführen, daß *Oidium lactis* schädlich für die Hefenzellen ist, welche es zum Absterben bringt. Dagegen ist *Oidium lactis* selbst recht widerstandsfähig gegen äußere Einflüsse. So wird zufolge LANG und FREUDENREICH erst bei 60 ° das Wachstum merklich verlangsamt. Jedoch sind

gerade bezüglich der Temperatur die Angaben der einzelnen Autoren schwankend. HANSEN (2) gibt als Maximum 37,5°, als Minimum 0,5° an, WEIDENBAUM (1) als Vegetationsoptimum 20°. Hier sei auch gleich das Temperaturmaximum für die Hautbildung mit 36,5—37,5°, das 5 Minimum mit 3° angegeben (nach HANSEN), worin der Charakter des *Oidium lactis* als echten Hautbildners sehr schön zum Ausdrucke kommt. Auch gegen Antiseptika scheint *Oidium* gut geschützt zu sein, denn in manchen Fällen versagte sogar einproz. Sublimatlösung; ebenso tötet Formaldehyd 1:1000 nicht, und 2,5-proz. Karbolsäure erst nach 30 Se-10 kunden. Obwohl dieser Pilz auf allen Nährböden gedeiht, so entwickelt er sich doch auf sauren günstiger.

Oidium lactis ist der Vertreter einer Arten- oder Varietäten-Gruppe. Dies lassen schon die abweichenden Angaben über Alkoholbildung, Einfluß der Temperatur u. a. schließen. M. GRIMM (1) hat auf Grund mor-15 phologischer und physiologischer Unterschiede im Aussehen der Kolonien, in Größe und Form der Oidien und im Peptonisierungsvermögen mehrere Arten aufgestellt, deren Verschiedenheit am deutlichsten bei Zuchten auf Kartoffeln und Casein hervortritt.

Oidium lupuli MATTHEWS et LOTT macht sich auf feucht gelagertem 20 Hopfen hier und da als rötlicher Staub bemerkbar, welcher aus den

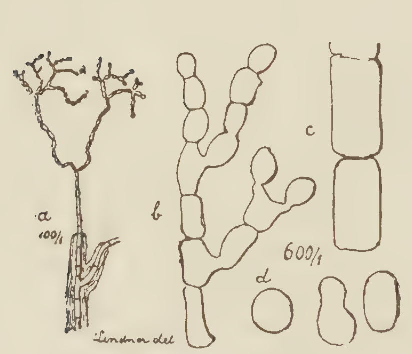


Fig. 101. Oidium lupuli.
a Lufthyphe, verästelt und in Oidien zerfallend; *b* Ende eines Astes derselben; *c* Oidien aus dem mittleren Teil einer breiten Hyphe; *d* isolierte Oidien vor dem Auskeimen. — Vergr. von *a*: 100, von *b*–*d*: 600. Nach LINDNER.

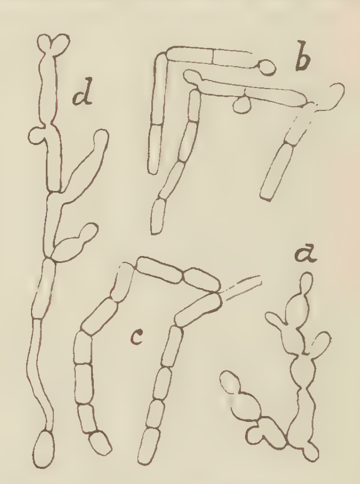


Fig. 102. Oidium pullulans.
a sprossende, hefenähnliche Zellen; *b* sprossende, oidiumartige Zellen; *c* Oidienbildung; *d* moniliaartige Hyphe. — Vergr. 600. Nach LINDNER.

Konidien dieses Schimmelpilzes besteht. Bei künstlicher Züchtung bildet er nach LINDNER (3) oberflächlich ein außerordentlich raschwüchsiges Mycel, dessen reich verästelte Lufthyphen in Oidien zerfallen (s. *Fig. 101*). Sie schwellen meist eiförmig an und vergrößern sich vor dem Aus-25 keimen durch Quellung, wobei sie sich fast kugelig abrunden. Ihre Farbe ist anfangs rötlich, später gelblich.

Zur Gattung *Oidium* rechnet P. LINDNER (2) auch einen Pilz, welchen er in den sogen. Zwickelproben aus den Lagerfässern der Berliner Versuchsbrauerei fand, und der morphologisch zwischen *Oidium* und *Saccha-*30 *romyces* steht. Dieses *Oidium pullulans* LINDNER zeigt (s. *Fig. 102*) nicht

bloß den oidienartigen Zerfall der Mycelfäden sondern auch ein Aussprossen derselben zu hefenzellähnlichen Wuchsgestalten. Häufig entwickelt sich der Pilz in den Tröpfchenzuchten ausschließlich hefenähnlich ohne jede Andeutung von gefächerten Hyphen, manchmal aber bilden sich reichlich Mycelfäden mit Sproßzellen. Auf Würze entsteht 5 rasch eine dünne Haut mit starker Ringbildung; auf Würzegelatine entwickeln sich gelblichbraune, mattglänzende, hefenähnliche Kolonien. Eine Gärung hat LINDNER nicht beobachtet. Die nahe Beziehung zu den Monilien ist bei diesem Pilze unverkennbar, und es würde sich vielleicht empfehlen, ihn dort unterzubringen. 10

Literatur

zum Kapitel Die Monilien und Oidien.

*Adametz, Leop., (1) Untersuchungen ü. d. niederen Pilze d. Ackerkrume. Dissert., Leipzig 1886, S. 39. *Aderhold, Rud., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1899, Bd. 5, S. 511. *Bau, A., (1) W. f. Brauerei, 1892, Bd. 9, S. 1185. *Bay, J. Christian, (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1894, Bd. 12, S. 90. *Behrens, Joh., (1) Landw. Versuchsstationen, 1895, Bd. 46, S. 163. *Bonorden, (1) Handbuch d. allg. Mykologie. Stuttgart 1851. *Bräutigam, Walter, (1) Unters. üb. d. Mikroorganismen in Schlämpe u. Biertrābern. Dissert., Leipzig 1886. *Buchner, Ed., und Meisenheimer, Jac., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1903, Bd. 40, S. 167. *Cienkowski, L., (1) Bulletin etc. p. l'Académie imp. de St. Pétersbourg, 1872, Bd. 17, S. 513. *Fischer, B., und Brebeck, C., (1) Zur Morphologie, Biologie u. Systematik d. Kahmpilze etc., Jena 1894. *Fischer, Emil, und Lindner, P., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1895, Bd. 28, S. 3037. *Grimm, M., (1) Landw. bakter. Laborat. am Ministerium d. Agricultur, St. Petersburg, 1900, S. 18. *Guilliermond, Al., (1) Revue génér. botan., 1903, Bd. 15, S. 49. *Hansen, E. Chr., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1888, Bd. 2, S. 143. — (2) Ebenda, 1902, Bd. 5, S. 68. — (3) Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet, 1879, Bd. 1, S. 185 u. 226. *Harz, C. O., (1) Sitzber. d. Ges. f. Morphologie u. Biologie, München, 1901, Bd. 16, S. 36. *Heinze, B., und Cohn, E., (1) Z. f. Hyg., 1904, Bd. 46, S. 286. *Lang, M., und Freudenreich, Ed. von, (1) Landw. Jahrb. d. Schweiz, 1893, Bd. 7, S. 229. *Laser, H., (1) Z. f. Hyg., 1891, Bd. 10, S. 513. *Lindner, P., (1) W. f. Brauerei, 1898, Bd. 15, S. 209. — (2) Mikroskop. Betriebskontrolle in d. Gärungsgewerben, 4. Aufl., Berlin 1905. — (3) W. f. Brauerei, 1894, Bd. 11, S. 1312. *Maassen, Alb., (1) Arb. Kais. Ges.-Amt, 1901, Bd. 18, S. 21. *Mach, Edm., und Portele, K., (1) Landw. Versuchsstationen, 1892, Bd. 41, S. 233. *Marpmann, (1) Z. f. angewandte Mikroskopie, 1896, Bd. 2, S. 68. *Mirsch und Eberhard, (1) D.R.P. 149432. *Weidenbaum, A., (1) Arb. d. St. Petersburger naturf. Ges., 1891, S. 26. *Went, F. A. F. C., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1901, Bd. 7, S. 544. — (2) Jahrb. wiss. Bot., 1901, Bd. 36, S. 611. *Went, F. A., und Prinsen-Geerligs, H. C., (1) Verhandl. d. k. Akad. v. Wetenschappen te Amsterdam, 1894, Ser. II, Bd. 4, Nr. 2. *Zopf, W., (1) Die Pilze. Breslau 1890.

Sechster Abschnitt.

Die Enzyme und die Enzymwirkungen der Hefen.

(Manuskript-Einlauf: 24. Juli 1906.)

17. Kapitel.

Die Alkoholase.

Von Dr. Rudolf Rapp,
Oberapotheker am städt. Krankenhaus zu München.

§ 79. Geschichtliche Einleitung.

Als durch Cagniard-Latour (1) und Th. Schwann (1) die pflanzliche Natur der Hefe erwiesen und die Lehre von ihrer gärungserregenden Wirkung in ganz neue Bahnen gelenkt war, entstanden im Laufe der 5 nächsten Dezennien eine Reihe von Theorien, welche die gärungserregende Eigenschaft der Hefe teils auf physikalische, teils auf chemische, teils auf physiologische Wirkungen derselben zurückzuführen suchten. Der wichtigsten dieser Theorien ist bereits auf S. 1—22 des Ersten Bandes gedacht.

10 Wenn von diesen Theorien bis vor kurzem diejenige von Pasteur die meisten Anhänger aufweisen konnte, so hatte das seinen Grund darin, daß sie am geistvollsten ausgearbeitet war, und daß Pasteur durch seine systematisch betriebene Forschung erst die Grundlage zur Gärungschemie gegeben hat. Im übrigen hat Pasteur auf den Arbeiten von 15 Schwann weitergebaut, als dessen Schüler, wie auch Delbrück (2) hervorhebt, er sich bezeichnete, und er ist also eigentlich nicht der Begründer der neuen Epoche (vergl. Bd. I, S. 18).

In diesem Paragraphen wollen wir uns hauptsächlich mit denjenigen Theorien befassen, welche die Gärung als Enzymwirkung auffassen. 20 Dahin sind die Ansichten über die Gärung von M. Traube, von J. Liebig und von Hoppe-Seyler zu rechnen. M. Traube (1) schreibt: „Die Hefe wirkt als chemisches Ferment, welches den in einer chemischen Substanz gebunden enthaltenen Sauerstoff auf eine andere überträgt,

d. h. daß sie imstande sei, nach der einen Seite hin reduzierend und nach der anderen hin oxydierend einzugreifen. M. BERTHELOT (2) stimmte ihm bald darauf zu. TRAUBE (2) wies dann im Jahre 1874 nochmals auf seine Meinung hin, nachdem kurz zuvor O. BREFELD (1) auf Grund eines freilich nicht ganz einwandsfreien Untersuchungsverfahrens zu der allerdings nicht viel sagenden Aeußerung gelangt war, daß Hefenzellvermehrung und Alkoholgärung zwei wohl auseinander zuhaltende Erscheinungen seien. Schon im Jahre 1839 hatte J. LIEBIG (1) die Gärung und Fäulnis als Folgen der Mitteilung einer chemischen Bewegung bezeichnet, welche von einem im Zerfall begriffenen eiweißartigen Körper („Ferment") ausgeht. Später (1870) drückte sich dieser Forscher (2) dahin aus, daß er dieses chemische Ferment als eine in dem Protoplasma der Hefenzellen enthaltene stickstoff- und schwefelhaltige Substanz bezeichnete, die sich im Zustande der Zersetzung und Umlagerung befinde. Der Zucker der Gärflüssigkeit solle sich dabei mit den Eiweißkörpern im Innern der Hefe zu einem festen Proteinsaccharat umsetzen, und dann erst scheide sich durch die Umlagerung eines oder einiger Bestandteile des Fermentes der Alkohol ab. Eine ähnliche Ansicht hatte auch an HOPPE-SEYLER (1) einen gewichtigen Verteidiger gefunden. Dieser Forscher schreibt: „Unzweifelhaft sind die niederen Organismen die Produzenten und Träger von Fermenten, ebensogut als die höheren. Mit der Trennung der Invertase von der Hefenzelle ist die Möglichkeit der Erzeugung eines alkoholbildenden Fermentes durch die keimende Hefe meines Erachtens im Prinzip entschieden."

Wenn somit von namhaften Gelehrten die Existenz eines gärungserregenden Enzyms angenommen wurde und die Möglichkeit der Erzeugung eines solchen durch die sprossende Bierhefe — z. B. durch Befunde von FIECHTER (1), daß Blausäure den Lebensprozeß und die Entwicklung der Hefe völlig aufhebe, nicht aber auch ohne weiteres die Fermentwirkung — wahrscheinlich gemacht war, so bestand noch immer ein schwerwiegender Unterschied zwischen den bereits bekannten Enzymen und dem der Alkoholgärung. Jene ersteren vermochten auch getrennt von der lebenden Zelle ihre Wirksamkeit zu äußern, das fragliche Enzym der Hefe aber war zunächst von der lebenden Zelle untrennbar. Wenn wirklich ein solches Enzym in der Bierhefe vorlag, warum ließ sich dieses nicht isolieren, da ja nach unseren Erfahrungen Enzyme nur in gelöstem Zustande wirksam sind, warum vermochte nur die Hefenzelle selbst die gärungserregende Wirkung zu äußern? Diese Frage mußte besonders dann als eine wichtige aufgeworfen werden, als es BERTHELOT und LIEBIG gelungen war, die Invertase getrennt von der Hefenzelle abzuscheiden.

Alle Versuche, welche von Forschern der verschiedensten Zeiten zur Abtrennung eines alkoholbildenden Enzyms von der Hefenzelle angestellt wurden, sind negativ ausgefallen. So verliefen die Untersuchungen von BERTHELOT (1), das Enzym durch Maceration aus der Hefe zu erhalten, erfolglos. MITSCHERLICH (1), HELMHOLTZ (1), DUMAS (1) u. a. haben die Hefenflüssigkeit filtriert oder durch Diffusion mittels feiner Membran die Hefe von den gelösten Bestandteilen zu trennen versucht; aber in allen diesen Versuchen trat keine Gärung ein, solange eine neue Infizierung mit Hefenzellen völlig verhütet wurde. Selbst in voller Gärung begriffene Bierwürze gärt alsbald nicht mehr, wenn durch Filtrieren die Hefenzellen getrennt und ein Hinzutreten von neuen Hefenzellen verhindert wird. Dieser Versuch wurde vor kurzem von WRÓBLEWSKI (4)

wiederholt, der die Filtration durch einen Sandstein hindurch ausführte. Hiervon wieder abweichende Beobachtungen wurden von COLIN (1) und später von FLECK (1) gemacht. Jedoch sind diese Untersuchungen unbrauchbar, da sie nicht streng steril durchgeführt wurden.

5 Andere Forscher schlugen wieder einen anderen Weg ein, welcher zur Trennung des gärungserregenden Enzyms von der Hefenzelle führen sollte. Man hoffte nämlich, daß der durch Zerreißen der Zellmembran freigewordene Zellinhalt Gärung aufweisen würde. Derartige Versuche stellten LÜDERSDORFF (1) und C. SCHMIDT in Dorpat sowie M. MANASSÈIN 10 an. Ersterer zerrieb Hefe auf einer mattgeschliffenen Glasplatte mittels eines gläsernen Läufers. C. SCHMIDT (1) benötigte, um 1 g Hefe zu zerreiben, sechs Stunden; die Zerreibungsprodukte aber zeigten keine Gärwirkung. M. MANASSÈIN (1) versuchte, die Lebensfähigkeit der zu den Gärungsversuchen verwendeten Hefenzellen, ohne die Enzyme zu ver-15 nichten, durch Einwirkung von Siedehitze aufzuheben.

Aus all diesen Mitteilungen mußte als feststehende Tatsache angenommen werden, daß die Existenz eines Enzyms der Alkoholgärung in der Bierhefe experimentell nicht nachzuweisen sei, daß vielmehr für die Einleitung und die Dauer der geistigen Gärung immer die Gegenwart 20 und die Vermehrung lebender Hefenzellen notwendig seien.

Wenn zwar durch diesen Tatbestand die Ansicht über das Vorhandensein eines gärungserregenden Enzyms scheinbar als unhaltbar gelten mußte, so trugen weitere Untersuchungen und Beobachtungen wieder dazu bei, daß die Enzymtheorie nicht zur Ruhe gelangte. Besonders 25 die Chemiker hielten begreiflicherweise an der Existenz eines Enzyms fest. Daß es nicht gelingen wollte, ein Enzym, welches Zucker in Alkohol und Kohlensäure spaltet, in wirksamen Zustande aus der Hefe abzuscheiden, wurde gewöhnlich so erklärt, daß durch die bisherigen Behandlungsweisen der Hefe das Enzym wahrscheinlich in seiner Zu-30 sammensetzung verändert und unwirksam werde. Wenn auch die Alkoholgärung ohne Hefe bisher nicht gelingen wollte, so berechtigte dies noch keineswegs zu der Annahme, daß es auch in der Zukunft nicht gelingen werde, für die Darstellung dieses Enzyms eine Methode zu finden, welche dessen Wirksamkeit unverändert läßt.

35 Solche Ansichten von dem Vorhandensein eines Alkoholgärungs-Enzyms mußten immer festeren Boden gewinnen, als es P. MIQUEL (1) im Jahre 1890 gelang, nachzuweisen, daß die Harnstoffgärung nicht direkt durch die Lebenstätigkeit der anwesenden Bakterien sondern durch Vermittlung eines von ihnen abtrennbaren Enzyms, der Urase, 40 bewirkt wird (s. Bd. III, S. 82), und als E. FISCHER und P. LINDNER (1) in *Monilia candida* (s. S. 336) einen Stoff, der ähnlich der Invertase den Rohrzucker zerlegt, nach Zerreiben der Zellen mittels Glaspulvers isolierten. Zu noch größerer Wahrscheinlichkeit gelangten diese Ansichten, als E. FISCHER (1) die stereochemische Betrachtungsweise auch auf die 45 Enzyme übertrug (s. Bd. I, S. 266) und nachwies, daß der früher vielfach angenommene Unterschied zwischen der chemischen Tätigkeit der lebenden Zellen und der Wirkung der chemischen Agentien inbezug auf molekulare Asymmetrie tatsächlich nicht bestehe, und als sich im Laufe der Zeit die Zahl der Mitteilungen häufte, daß in höheren Pflanzen und in 50 Früchten unter gewissen Bedingungen ohne Gegenwart von Hefenzellen die Bildung von Alkohol allein, sowie von Kohlensäure und Alkohol nachgewiesen werden könne. Hierher dürften auch die Veröffentlichungen von SCHUNCK (1) und von DUCLAUX gerechnet werden. Ersterer fand

nämlich, daß bei der Krappgärung (s. 26. Kap. d. I. Bds.) Alkohol, Bernsteinsäure und Kohlensäure auftreten, was aber, wie der Verfasser selbst für möglich hält, vielleicht durch die Anwesenheit lebender Mikroorganismen bedingt war. Ueber die durch DUCLAUX (1) beobachtete Entstehung von Alkohol in alkalischer Zuckerlösung vergl. man Bd. I, S. 515. 5
Schließlich seien hier noch die Beobachtungen von WILL (3) erwähnt, der Hefe bei niederer Temperatur trocknete und nach neunjähriger Aufbewahrung nicht mehr Wachstum, wohl aber noch Gärungserscheinungen nachweisen konnte (s. Bd. V, S. 111).

So hatten sich zwar vor dem Jahre 1896 in den jahrzehntelangen 10
Erörterungen über das Wesen der Gärung die Ansichten wieder zugunsten der Enzymtheorie verschoben. Aber der experimentelle Nachweis, daß das gärungserregende Agens von der lebenden Zelle trennbar und daß also die Zerlegung von Zucker in Alkohol und Kohlensäure als ein rein chemischer Vorgang anzusehen ist, muß doch als ganz neue, 15
wichtige Tatsache bezeichnet werden. Und diesen Nachweis hat uns ED. BUCHNER (1) in einfacher und exakter Weise am Ende des Jahres 1896 gebracht, indem er nur durch rein mechanische Mittel nach Zerreißung und Entfernung der Zellmembranen und des Protoplasmaschlauches den Inhalt der Hefenzelle allein als Saft gewann, der das Phänomen der 20
Zuckerzerlegung zeigt und praktisch als zellenfrei bezeichnet werden kann. Wenn diese Entdeckung für unsere theoretische Anschauung von der größten Bedeutung geworden und durch sie auch für das Gärungsgewerbe eine Summe von Anregung geschaffen worden ist, so scheint sie jedoch für die direkte technische Verwertung keine brauchbare Ver- 25
wendung ergeben zu wollen. Solange selbstverständlich zur Gewinnung des Enzyms die Hefenzelle selbst herangezogen werden muß, solange kann an eine praktische Ausnützung der Entdeckung nicht gedacht werden, da wir ja immer den größeren Umweg einschlagen würden. Zu der nämlichen Ansicht gelangte auch WORTMANN (1) in betreff der Wein- 30
gärung, bei welcher ja der gesamte Stoffwechsel der lebenden Hefe in Betracht kommt. Sehr beifällig drückt sich über die Entdeckung E. FISCHER (2) aus. Ueber die praktische Verwendung und die Bedeutung von Dauerhefe wird auf S. 362 geredet werden. Das Verfahren der Saftbereitung durch Zerreiben und Auspressen fand zweckmäßige 35
Anwendung durch Arbeiten von M. HAHN (1), MAZÉ (1), TAKAHASHI (1), WEINLAND (1), KOHNSTAMM (1), CZAPEK (1), STOKLASA (1) und seine Mitarbeiter, COHNHEIM (1), KRASNOSSELSKY (1), MAXIMOW (1).

§ 80. Bereitung des Hefenpreßsaftes.

Das Verfahren zur Herstellung des Hefenpreßsaftes wurde ursprüng- 40
lich im Münchner Hygienischen Institute unter wesentlicher Beihilfe von M. HAHN, der die Anwendung von Kieselgur und einer hydraulischen Presse vorschlug, ausgearbeitet. Es gliedert sich in folgende fünf Teile: 1. Waschen der Bierhefe, 2. Entwässern der gewaschenen Hefe, 3. Mischen mit Quarzsand und Kieselgur, 4. Zerreiben zu einer teigförmigen Masse, 45
5. Auspressen, wobei 4. und 5. wiederholt werden. Der Wichtigkeit wegen mögen im folgenden einzelne dieser Arbeiten genauer erläutert werden.

Das Waschen der Brauereihefe hat sich als nötig erwiesen. Es kann zweckmäßig in einem von HAGENMÜLLER (1) erfundenen Apparate 50

ausgeführt werden. Vor dem Mischen hat eine kräftige Entwässerung der Hefe zu erfolgen. Zu diesem Zwecke wird sie in ein starkes, baumwollenes, nicht-appretiertes Preßtuch eingeschlagen, wie es als wasserdichtes Segeltuch zum Ueberdecken von Zelten Anwendung findet, und bei einem Drucke von 50 Atmosphären 5 Minuten lang ausgepreßt. Der so erhaltene Hefenkuchen mit ca. 70 Proz. Wassergehalt wird nun mit feinem Quarzsand (Korngröße entsprechend 200 Maschen auf 1 qcm Siebfläche) und mit Kieselgur oder Infusorienerde im Verhältnisse 1000 g Hefe, 1000 g Quarzsand, 2—300 g Kieselgur gemischt und durch ein grobes Sieb (9 Maschen auf 1 qcm) geschlagen. Das Zerreiben geschieht in kleinen Portionen von 300—400 g entweder in einer Zerreibungsmaschine oder in einer großen Porzellanreibschale mit beschwertem Pistille und Pistillführung, und zwar so lange, bis sich eine teigförmige Masse bildet, welche von selbst zusammenballt und von der Wandung der Reibschale sich loslöst. Die gesammelten teigförmigen Portionen werden sodann in ein angefeuchtetes Preßtuch von obiger Beschaffenheit eingeschlagen, in den Preßkorb einer hydraulischen Handpresse eingelegt und bei einem allmählich gesteigerten Drucke bis zum Gesamtdrucke von 90 kg auf 1 qcm ausgepreßt. Um eine größere Ausbeute zu erzielen, wird der Preßkuchen nochmals in kleinen Portionen in der Reibschale zerrieben, wobei früher ein Zusatz von Wasser erfolgte, der jedoch später, als überflüssig erkannt, weggelassen wurde. Den abfließenden Hefenpreßsaft läßt man direkt auf ein Faltenfilter und von hier aus in ein mit Eis gekühltes Gefäß träufeln.

Die nach diesem Verfahren sich ergebende Ausbeute an Preßsaft wechselt zwischen 450—500 ccm, so daß nach Abzug der Zellhäute etwa 60 Proz. des gesamten Zellinhaltes erhalten werden. Wróblewski (4) bekam eine Ausbeute an Preßsaft von 72,7 Proz., Macfadyen, Morris und Rowland (1), die mit 200—350 Atmosphären Druck arbeiten, 5 bis 87 Proz., Lange (1) bei 15 Proz. Wasserzusatz 44 Proz. und Ahrens (1) schließlich 70 Proz. Der Preßkuchen ist nach diesen Ausbeuten noch nicht erschöpft, sondern es können durch kleinen Wasserzusatz und abermaliges Zerreiben und Auspressen noch recht gärkräftige Anteile erzielt werden; die hierbei aufgefangenen späteren Fraktionen zeigen zufolge Buchner und Rapp (7) meist eine stärkere Gärkraft als der erste Anteil. Auch nach Will (2) enthält der rückständige Preßkuchen noch erhebliche Mengen an Zymase. Vermutlich wird das gärungserregende Enzym durch weiteren Wasserzusatz gelöst.

Bei richtiger Herstellung des Hefenpreßsaftes sind im Safte mikroskopisch nur vereinzelte, unverletzte Hefenzellen zu finden, welche — was gleich hier bemerkt sein möge — nicht die Gärungserscheinungen, die der Preßsaft tatsächlich zeigt, hervorbringen können. Auch der Bodensatz nach 3- bis 12-tägigem Stehen im Eisschranke ist frei von Mikroorganismen, und es sind unter dem Mikroskope lediglich Eiweißgerinsel zu entdecken.

Eine bakteriologische Untersuchung des Preßsaftes, von Buchner und Rapp (2) ausgeführt, ergab pro 1 ccm Saft auf Fleischwasser-Gelatine je 50—100 Bakterien-Kolonien und auf Bierwürze-Gelatine je 4 Hefenkolonien. Der Preßkuchen wurde von H. Will (2) mikroskopisch untersucht, wodurch gefunden wurden:

	leere Häute	angegriffene Zellen	unverletzte Zellen
Im ersten Versuche	55,0 Proz.	28,0 Proz.	17,0 Proz.
„ zweiten Versuche	15,6 „	81,0 „	2,7 „

Bei einer so wichtigen neuen Entdeckung mußte eine Nachprüfung von seiten anderer Forscher als wünschenswert begrüßt werden. Eine solche erfolgte von H. Will (1), von M. Delbrück (1), von J. R. Green (1) und von Martin und Chapmann (1). Von diesen Forschern, welche bei der Nachprüfung zuerst negative Resultate erhalten hatten, erzielten die ersten drei bei einer erneuten Untersuchung positive Ergebnisse, so daß mit negativer Nachprüfung nur mehr Martin und Chapmann ausstehen. Positive Resultate, und zwar sehr gute Preßsaftgärungen, bekamen Wróblewski (1), Ahrens (1), A. Stavenhagen (1), Macfadyen, Morris und Rowland (1), A. Harden und Young (1). Ahrens schreibt: „Immer haben wir, nachdem wir die Technik heraus hatten, einen vorzüglich wirkenden Preßsaft gewonnen. Auch wir hatten zu Anfang unserer Versuche keine brauchbaren positiven Resultate erhalten, während wir später niemals einen Mißerfolg zu verzeichnen hatten."

Zur Buchner-Hahn'schen Methode der Hefenpreßsaftbereitung gesellten sich noch weitere Herstellungsweisen. Vor allem wurde von Ed. Buchner (8) selbst versucht, durch flüssige Luft oder Zerreiben mit fester Kohlensäure einen Hefensaft zu gewinnen. Es wurden gleiche Mengen Hefe und feste Kohlensäure eine halbe Stunde lang zerrieben und die Flüssigkeit abgesaugt. Die Ausbeute betrug 20 Proz. Ferner wurde von Albert (3) aus Dauerhefe durch Zerreiben mit Sand und Kieselgur sowie Zusatz eines 10 Proz. Glycerin enthaltenden Wassers und darauffolgendes Auspressen ein gärkräftiger Auszug erhalten. Ein neues Verfahren zur Preßsaftgewinnung wurde von Macfadyen, Morris und Rowland (1) angewendet. Sie erzielten durch schnell aufeinander folgende Zusammenstöße der Hefe mit Silbersandteilchen in einer neuen Vorrichtung einen Zellsaft. Keine Zelle blieb bei diesem Verfahren unversehrt. Eine Erwärmung der Hefe bei dieser Anordnung wurde durch Abkühlung mit Salzsole von — 5° C hintangehalten. Die Ausbeute an Saft betrug 35 Proz. Martin und Chapmann (1) haben statt durch Auspressen mittelst Zentrifugieren den Saft gewonnen.

Andere Autoren verfolgten den Zweck, keine gärkräftigen sondern nur **eiweiß- oder extraktreiche Auszüge** zu erzielen und erreichten dies durch energische Plasmolyse. So haben C. J. Lintner (1) mit Salzen, M. Hahn und L. Geret (1) mit Chloroform, Dormeyer (1) mit Aether und Chloroform, J. de Rey-Pailhade (1) mit 22-proz. Alkohol einen Zellsaft gewonnen. Speziell um ein dem Fleischextrakt ähnliches Hefenpräparat zu erhalten, haben E. de Meulemeester (1) mit Gummi arabicum, H. van Laer (1) mit 2 Proz. Kochsalz und H. Buchner und M. Gruber (1) Hefe mit Aether zu versetzen vorgeschlagen. Im Handel kommen solche Hefenextraktpräparate unter den Namen Siris, Wuck, Ovos u. dergl. m. vor; man vergl. darüber Bd. V, S. 122 u. f.

§ 81. Allgemeine Eigenschaften des Preßsaftes.

Der nach dem Verfahren von Buchner und Hahn erhaltene Hefenpreßsaft stellt eine zwar opalescierende, sonst aber klare Flüssigkeit von gelber bis bräunlichgelber Farbe mit starkem Geruch und Geschmack nach Hefe dar. Frisch bereitet reagiert er schwach sauer; nach den Mitteilungen von Ahrens (1) aber ist die Reaktion des von ihm dargestellten Preßsaftes schwach alkalisch, sie wird jedoch schnell sauer.

Ebenso soll der frische Saft, welchen Wróblewski (4) sich bereitet hat, schwach alkalisch reagiert haben.

Nach Wróblewski's (4) Angabe ist der Hefenpreßsaft optisch nicht aktiv, was bei dem Gehalte an Eiweißstoffen überraschen muß. Die von Ed. Buchner (8) in dieser Hinsicht angestellten Untersuchungen ergaben bisher noch kein abschließendes Resultat.

Wenn man den Hefenpreßsaft mit starker Lauge oder mit Mineralsäure oder Essigsäure versetzt, so tritt in ihm eine voluminöse Fällung ein. Beim Erwärmen findet schon bei 35—40° C Eiweißgerinnung statt, die bei höheren Temperaturen noch viel stärker wird, so daß schließlich die ganze Masse geronnen erscheint. Es dürfte dies wohl das erstemal gewesen sein, daß aus Sproßpilzzellen ein so stark eiweißhaltiges Präparat gewonnen wurde. Wróblewski (4) unterscheidet bei partieller Koagulation mehrere koagulierbare Eiweißstoffe. Er bemerkte, daß die Koagulationstemperatur des bei 41° C koagulierenden Eiweißstoffes mit derjenigen Temperatur zusammenfällt, welche die vergärende Wirkung des Saftes aufhebt, daß ferner der bei 41° C koagulierende Eiweißstoff vor allen anderen verdaut zu werden scheint.

Die chemische Analyse verschiedener Säfte ergab zufolge Ed. Buchner (8): ein spez. Gewicht von 1,027—1,057, einen Trockengehalt von 8,5—14,3 Proz., gerinnbares Eiweiß von 5,0—6,0 Proz., Gesamt-Stickstoff von 0,82—1,45 Proz., organischen Phosphor ca. 0,228 Proz., organischen Schwefel ca. 0,065 Proz., Asche 1,3—1,8 Proz. (vergl. auch S. 83). Die Aschenbestandteile sind Kalium, Natrium, Calcium, Magnesium, Phosphorsäure, Schwefelsäure, Chlor und Kieselsäure (letztere von der Kieselgur stammend). Ahrens (1) fand in aschenfreier Substanz 45,4 Proz. Kohlenstoff, 7,5 Proz. Wasserstoff und 10,64 Proz. Stickstoff; vergl. auch S. 92. Wróblewski (1 u. 4) hat weiterhin im Hefenpreßsafte folgende Körper nachgewiesen: Albumine, Globuline, mucinartige Körper, Proteosen, Peptone, Nucleoalbumine, ein zusammengesetztes Kohlenhydrat und eine eigenartig kristallisierende Substanz, die beim Verbrennen große Menge von phosphorhaltiger Asche zurückläßt. Außerdem sind vorhanden: Tyrosin, Leucin, Glutaminsäure, stickstoffhaltige Basen, Xanthinkörper, eine Substanz, die Schwefel zu Schwefelwasserstoff und Jod zu Jodwasserstoff reduziert, Lecithin, Glycerin, Calcium- und Magnesiumphosphat, eigenartige flüchtige Stoffe und mehreres andere.

Der Hefenpreßsaft kann, wie Buchner und Rapp (5) zeigten, unbeschadet all seiner Eigenschaften zum Trocknen gebracht werden. Am zweckmäßigsten wird er zuerst in einem Soxhlet'schen Vakuumapparate bis zur Sirupkonsistenz eingedickt; dann kann das vollständige Trocknen in dünner Schicht an der Luft bei 22° C oder 34—35° C geschehen. Das hierbei erhaltene, an getrocknetes Hühnereiweiß erinnernde Präparat löst sich in Wasser fast völlig. Die Gärkraft hat sich beim Trocknen von Münchner Hefenpreßsaft nicht verändert, während der Berliner Hefenpreßsaft nach dieser Behandlung zufolge Ed. Buchner (8) einen Verlust von 18—74 Proz. der vorhandenen Gärkraft aufwies.

Das Interessanteste an dem Hefenpreßsafte sind dessen Enzyme. Von solchen wurden bisher beobachtet: ein gärungserregendes, ein hydrolytisches (und zwar Maltose, Rohrzucker und Glycogen spaltendes), ein proteolytisches, ein oxydierendes, ein reduzierendes, ein fettspaltendes, ein Wasserstoffsuperoxyd zersetzendes Enzym und ein Labenzym (s. d. 19. u. 20. Kap.). Von diesen Enzymen ist das beachtenswerteste wieder jenes, unter dessen Einwirkung Zucker in Alkohol und Kohlensäure ge-

spalten wird. Nach den neueren Untersuchungen von BUCHNER und MEISENHEIMER (3) spielt die Milchsäure beim Zerfalle des Zuckers eine hervorragende Rolle und ist als Zwischenprodukt aufzufassen. Diese beiden Forscher und ebenso MAZÉ (2) führen die Spaltung von Zucker bei der alkoholischen Gärung unter intermediärer Bildung von Milchsäure als Wirkung zweier verschiedenen Enzyme zurück und bezeichnen das den Zucker in Milchsäure spaltende als Hefenzymase, wogegen das die Milchsäure in Alkohol und Kohlensäure zerlegende Enzym Lactacidase heißen soll. Eine quantitative Bestimmung des absoluten Gehaltes eines Hefenpreßsaftes an gärungserregenden Enzymen ist derzeit noch untunlich. Möglich ist in dieser Richtung bisher nur die unter gleichen Bedingungen ausgeführte Vergleichung der Größe der gärungserregenden Kraft zweier Preßsäfte. Jeder Preßsaft, welcher richtig dargestellt ist, zeigt Gärvermögen, sofern die hierzu verwendete Hefenart überhaupt ein gärungserregendes Enzym besitzt oder ein solches bloß vorübergehend aufgespeichert hatte. Die Gärkraft und die Gärungsenergie ist sehr verschieden und abhängig von der Hefenrasse und den Bedingungen (s. S. 363), unter welchen die Hefe zur Saftbereitung Verwendung gefunden hat. Nach Zusatz von 8 g Rohrzucker und 0.2 ccm Toluol als Antiseptikum geben 20 ccm Hefenpreßsaft bei 22° C gewöhnlich nach 96 Stunden 0,7—1,87 g Kohlensäure. Gasvolumetrisch ausgedrückt ist zufolge ED. BUCHNER (8) mit 10.5 ccm Saft und 3.5 ccm 60-proz. Rohrzuckerlösung bei 28° C nach 90 Minuten bis zu 30 ccm Gas, also das Zweieinhalbfache des ursprünglichen Flüssigkeits-Volumens, zu erhalten. Andere Forscher bemerkten größere Schwankungen in der Gärkraft. So hat WRÓBLEWSKI (4) gasvolumetrisch aus 3.5 ccm Saft, 14 ccm Wasser und 3.5 ccm 60-proz. Rohrzuckerlösung 1.8—10 ccm Kohlensäure bekommen. Die Ergebnisse von MACFADYEN, MORRIS und ROWLAND (1) mit obergäriger Hefe sind so schwankende, daß man, wie sie selbst anführen, kein klares Bild erhalten kann. Günstigere Resultate bekamen A. HARDEN und YOUNG (1) bei einer Nachprüfung mit obergäriger Hefe. BUCHNER und ANTONI (1) stellten fest, daß die Preßsaftgärungen sowohl in Sauerstoff- als in Wasserstoff-Atmosphäre gleich stark sind. Hefenpreßsaft wurde in München von BUCHNER und RAPP (1—8) aus untergärigen Brauereihefen, in Berlin von BUCHNER, ALBERT, SPITTA, MEISENHEIMER, ANTONI aus Unterhefen aus drei Brauereien, von LANGE (1) aus Preßhefe, von R. GREEN (2) aus *Saccharomyces cerevisiae* (HANSEN), von TAKAHASHI (1) aus Sakéhefe, von WRÓBLEWSKI (1—4) aus Handelshefe und Weinhefe, Reinkulturen von Bierhefe und Okocimer Brauereibetriebshefe, von MACFADYEN, MORRIS und ROWLAND (1) und von HARDEN und YOUNG (1) aus obergäriger Hefe hergestellt.

Der weiteren Besprechung anderer Eigentümlichkeiten des Preßsaftes möge vorerst der Hinweis darauf vorangeschickt werden, daß die Feststellungen betreffs der Beeinflußbarkeit des gärungserregenden Enzyms durch verschiedene Faktoren bisher alle nur am Hefenpreßsafte und nicht an dem reinen Enzyme selbst vorgenommen werden konnten, so daß also unentschieden bleibt, inwieweit die erhaltenen Ergebnisse durch Einflüsse von seiten der übrigen Bestandteile des Saftes nach der einen oder anderen Richtung hin mitbestimmt wurden.

Solche Einflüsse treten beim Aufbewahren des Hefenpreßsaftes zutage. BUCHNER und RAPP (1) haben bemerkt, daß er um so unwirksamer wird, je länger und bei je höherer Temperatur man ihn aufbewahrt. Die nämliche Wahrnehmung machten dann auch R. ALBERT (1)

und Macfadyen, Morris und Rowland (1). Am besten behält der Hefenpreßsaft seine gärungserregende Eigenschaft, wenn man ihn in Eis verpackt lagert. An diesem Verhalten können zufolge Ed. Buchner (4) nur tiefgreifende Veränderungen schuld sein, wie sie durch die verdauende Wirkung (s. d. 20. Kap.) des Saftes hervorgerufen werden. Eine andere Ursache der Abnahme an Gärkraft könnte auch in der sich allmählich einstellenden sauren Reaktion des Saftes gesucht werden, nachdem Ahrens (1) bemerkt hat, daß der Saft über Nacht eine Zunahme von 0,305 Proz. auf 0,81 Proz. Säure (als Milchsäure berechnet) zeigte.

Die verdauende Wirkung sowohl als auch die Säurebildung im Preßsafte können zum größten Teil dadurch ausgeschaltet werden, daß man ihn eintrocknen läßt (s. S. 352 und Bd. V, S. 102). Die Haltbarkeit des Trockensaftes ist in der Tat eine sehr große: nach Mitteilungen von Buchner und Rapp (6 u. 8) konnte innerhalb 12 Monate noch keine nachweisbare Abnahme der Gärkraft konstatiert werden. Zu demselben Ergebnisse gelangte auch R. Albert (1). Von der Haltbarkeit der Gärkraft bei steriler Dauerhefe wird auf S. 364 geredet werden.

Eine Selbstgärung, die bei der lebenden Hefe (s. d. 19. Kap.) vorkommen kann, ist auch im Hefenpreßsafte bemerkt worden; sie ist auf den Gehalt der Hefe an Glycogen (s. S. 96) zurückzuführen. Die Selbstgärung im Münchner Hefenpreßsafte war, ganz entsprechend den Befunden von Will (2), daß sich in Münchner Preßhefe nur Spuren von Glycogen finden, immer gering und betrug nach Untersuchungen von Buchner und Rapp (7) nicht mehr als entsprechend 0,45 g Kohlensäure pro 100 ccm Saft. Größer war sie zufolge Ed. Buchner (7) im Berliner Preßsafte, und zwar entsprechend 0,40—1,10 g Kohlensäure pro 100 ccm Saft. Am größten war die Selbstgärung, ja sogar größer als bei Anwesenheit von Rohrzucker, bei dem von Macfadyen, Morris und Rowland (1) studierten Preßsafte aus obergäriger Hefe, nämlich 65—900 ccm auf 100 ccm Saft. Leider wurde von diesen Forschern die Ursache dieser ungeheuer großen Selbstgärung nicht weiter verfolgt. Der Befund steht mit den Ergebnissen von Ed. Buchner (7) nicht im Einklang und ist wahrscheinlich auf Gegenwart von lebenden Bakterien zurückzuführen. Bei der später erfolgten Nachprüfung durch Harden und Young (1) war zwar die Selbstgärung größer als in den Versuchen von Buchner, zeigte aber keine so großen Unterschiede als bei den Untersuchungen von Macfadyen, Morris und Rowland.

Abweichende Resultate haben die einzelnen Forscher auch beim Filtrieren des Saftes durch Bakterienfilter erhalten. Während Buchner und Rapp (1) und ebenso Macfadyen, Morris und Rowland (1) nur eine Abnahme der Gärkraft des Saftes, welcher durch ein Chamberland-Filter gedrungen war, (besonders bei einem Vergleiche der ersten und der später aufgefangenen Fraktionen) bemerkten, fand Wróblewski (4) die Gärkraft seines Preßsaftes nach dem Filtrieren durch Chamberlandfilter ganz vernichtet. Stavenhagen (1) konstatierte, daß nach dem Filtrieren durch Kitasato-Filter der Saft keine Gärkraft mehr zeigte. Diese letzteren Befunde finden ihre Erklärung vielleicht durch die Eigenschaft der Bakterienfilter, Eiweißstoffe entweder nur zum Teil oder gar nicht durchgehen zu lassen (vgl. Bd. I, S. 524).

Es kann also beim Filtrieren des Preßsaftes durch ein engporiges Filter ein Verlust an Eiweißstoffen bezw. an gärungserregendem Enzym stattfinden. Die Größe der Gärkraft des Saftes vor dem Filtrieren ist daher bei derartigen Versuchen wohl im Auge zu behalten. Denn wenn

durch das Filtrieren ein Verlust an Gärkraft zu erwarten ist, so muß diese vor dem Filtrieren eine ganz bedeutende sein, wenn der Saft nachher noch Gärvermögen zeigen soll. Nur auf solche Weise kann das oben erwähnte schlechte Ergebnis STAVENHAGEN's erklärt werden. Bemerkt sei hier noch, daß von BUCHNER und RAPP (1) beim Filtrieren 5 durch ein Chamberlandfilter wirklich ein zellfreier Hefenpreßsaft gewonnen wurde, der trotz der Abwesenheit jeglicher Keime tüchtige Gärkraft zeigte.

§ 82. Vorgänge, welche im Preßsafte infolge äußerer Einflüsse physikalischer oder chemischer Natur oder durch Lebewesen 10 sich abspielen.

Ueber den Einfluß der Temperatur auf den Verlauf der Alkoholgärung hat Ed. BUCHNER (8) Versuche mit Preßsaft angestellt. Sie ergaben, daß die Gärkraft am längsten bei 5—7° C anhält, daß die Gärung am raschesten bei einer Temperatur von 28—30° C einsetzt, daß aber 15 die absolut höchste Gärkraft bei 12—14° C erhalten wird. MACFADYEN, MORRIS und ROWLAND (1), welche diese Ergebnisse nachprüften, fanden, daß bei höherer Temperatur die Gärwirksamkeit vergrößert wird. Doch nahmen sie auf die Zeitdauer keine Rücksicht und dehnten ihre Versuche nur auf 48 Stunden aus. 20

Eingetrockneter Hefenpreßsaft dagegen hält höhere Temperaturgrade ohne Schaden für die Gärkraft aus. Sehr sorgfältig getrockneter Hefenpreßsaft kann nämlich nach BUCHNER und RAPP (6) auf 85° C acht Stunden lang erhitzt werden, ohne wesentlich an Gärkraft zu verlieren; auch sechsstündiges Erwärmen auf 97° C vernichtet die Gärkraft noch 25 nicht vollständig. Die auf S. 359 zu besprechende Alkoholätherfällung zeigt zufolge ED. BUCHNER (8) sogar, nachdem sie vier Stunden auf 105—110° C erhitzt worden ist, noch Gärkraft. Ebenso kann zufolge ED. BUCHNER (5) die später zu erwähnende Dauerhefe sechs Stunden bei 100° C an der Luft oder acht Stunden bei 100° C und dann zehn Stunden 30 bei 110° C lang im Wasserstoffstrome erhitzt werden, ohne das Gärvermögen völlig zu verlieren; bei 140—145° C eine Stunde lang gehalten, ist sie aber vernichtet. Man vergl. auch Bd. V, S. 113.

Aus bekannten Tatsachen war schon im voraus zu folgern, daß das Dialysieren des gärungserregenden Enzyms durch tierische Mem- 35 branen, wenn überhaupt so doch sicher nicht so leicht möglich sein werde. BUCHNER und RAPP (2 u. 3) haben dann auch tatsächlich festgestellt, daß das gärungserregende Enzym aus der lebenden Hefe nicht ausgewaschen werden kann und auch nicht in irgendwie beträchtlicher Menge durch Pergamentpapier hindurch dialysiert. Zu einem ähnlichen 40 Resultate kam auch R. ALBERT (3) mit steriler Dauerhefe, aus welcher er direkt mit Wasser oder Zuckerlösung, ohne daß er vorher die Zellmembranen zerstörte, kein gärungserregendes Enzym ausziehen konnte. Nach den neueren Untersuchungen von HARDEN und YOUNG (3) und den Nachprüfungen von BUCHNER und ANTONI (2) ist der Saft beim Dialy- 45 sieren mit Hilfe des MARTINS'schen Gelatinefilters bezw. im GÜRBER'schen Apparate bei 0° C nach 48 Stunden anscheinend fast wirkungslos; nach Zusatz aber des eingedampften Dialysats oder von aufgekochtem Preßsaft erweist er sich wieder (um das Dreifache und viel mehr) gärkräftig.

Centrifugieren des Preßsaftes bringt zufolge BUCHNER und RAPP (6) 50

keine Veränderung in der Gärkraft hervor; denn die verschiedenen Schichten des Saftes zeigten vor und nach dem Centrifugieren gleich große Gärkraft, vorausgesetzt, daß die Temperatur während des Centrifugierens sich nicht über das normale Maß erhob.

5 Die Alkoholgärung ist ein exothermischer Vorgang: es tritt beim Zerfallen des Zuckers in Alkohol und Kohlensäure positive Wärmetönung auf, welche diejenige bei den Wirkungen der übrigen Enzyme ganz bedeutend übertrifft. Dieses Thema haben behandelt: Fitz (1), Berthelot (3), Bouffard (1), Brown (1) und Rubner (1 u. 2). Während 10 Brown und auch Berthelot nur ausrechnen, daß die durch die Bildung des Alkohols und der Kohlensäure frei werdende Wärme die zur Spaltung der Dextrose erforderliche übersteigt, und ersterer die Zahl von 67 Kalorien, letzterer 33 Kalorien fand, stellte im Gegensatze hierzu Fitz durch direkte Versuche fest, daß eine 18-proz. Zuckerlösung bei der 15 Vergärung sich um 21° C erwärmt, daß davon aber 6° C auf die positive Wärmetönung außerhalb des eigentlichen Gärungsvorganges entfallen. Auch bei der zellfreien Gärung konnte dies, wenn auch nur in einem primitiven Versuche, von Ed. Buchner (8) deutlich nachgewiesen werden. Ebenso ermittelte Bouffard direkt in einem Liter Traubenmost die 20 Gärungswärme zu 23,5 Kalorien. Brown wiederholte diesen Versuch und bestimmte in Malzwürze die Gärungswärme von einem Gramm Maltose zu 119,2 Kalorien oder umgerechnet zum Vergleiche mit Bouffard's für ein Gramm-Molekül berechnete Zahl zu 21,4 Kalorien. Rubner schließlich arbeitete genaue Bestimmungsmethoden aus und empfiehlt 25 erstens eine Differenzmethode durch Bestimmung der Verbrennungswärme eines Nährbodens vor dem Wachstum von Keimen und nach dem Wachstum und zweitens eine direkte Methode durch Messung der entwickelten Wärme während des Lebensprozesses selbst. Als Verbrennungswärme von ein Gramm Trockensubstanz von Unterhefe fand Rubner 4475 Gramm-30 Kalorien, von ein Gramm Trockensubstanz von Oberhefe 4554 Gramm-Kalorien. Weitere Untersuchungen ergaben bei der Alkoholgärung als Gärungswärme für ein Gramm Rohrzucker im Mittel von 12 Versuchen die Zahl von 149,5 Gramm-Kalorien.

Die Wirkung der Enzyme ist stets in hohem Grade von der 35 chemischen Reaktion der Versuchsflüssigkeit abhängig. Nach Mitteilungen von Buchner und Rapp (1 u. 2) wird der Gärungsvorgang im Preßsafte durch Zusatz einer geringen Menge von Alkalien, wie Kaliumkarbonat, Dinatriumphosphat und alkalischer Arsenitlösung, beschleunigt. In demselben Sinne sprachen sich Wróblewski (4) und ebenso Harden und 40 Young (3) aus. Ersterer legte besonders den Phosphaten, und zwar sowohl allein als auch bei Anwesenheit von Säure und Alkalien, eine größere Bedeutung bei. Nach diesem Forscher (2) ist ein Säurezusatz von 0,05 Proz. Salzsäure oder Essigsäure für die Gärwirkung schädlich (vergl. auch S. 137). Salpetrige Säure wirkt noch stärker hemmend auf 45 die Zellsaftgärung als ihre Salze ein. Diese Schädigung durch Säuren fand Ed. Buchner (8) bei Essigsäure und Weinsäure, besonders aber bei Milchsäure nicht so stark. Es wird nämlich bei längerer Dauer der Versuche die anfangs bemerkbare geringere Kohlensäureentwicklung ausgeglichen; bei Milchsäurezusatz (0,3 Proz.) war die Gärkraft sogar 50 noch größer als in den Kontrollproben.

In betreff des Einflusses anderer Salze auf die Preßsaftgärung (vergl. S. 135) haben Ed. Buchner und Rapp (3 u. 8) durch quantitative Versuche festgestellt, daß die Chloride des Natriums und des Ammoniums

in einproz. Lösung nur wenig, die Sulfate des Natriums, Ammoniums, Magnesiums und das Natriumnitrat in einproz. Lösung bedeutend mehr und das Calciumchlorid ganz besonders stark die Gärkraft schädigen; dagegen wieder übt Baryumchlorid in einproz. Lösung keinen ungünstigen Einfluß aus, sondern wirkt eher vorteilhaft. Mangansulfat, Aluminiumsulfat, Ferrosulfat und Kobaltsulfat zeigten nach BUCHNER und ANTONI (2) keine oder nur schädliche Wirkung. Aus der Reihe der organischen Stoffe bewirkten Harnstoff und Glycocoll eine Erhöhung der Gärkraft; direkt schädlich waren hingegen Antipepton, Hemi- und Protalbuminose. Als besonders förderlich bei der Preßsaftgärung erwiesen sich die Phosphate, und zwar die sekundären mehr als die primären, so daß ein Zusatz von 1—4 Proz. guten Erfolg hatte. WRÓBLEWSKI (4) findet als das Optimum für sekundäre Phosphate einen Zusatz von 1,25 Proz. Eine Begünstigung der Gärkraft in erhöhtem Maße von seiten der Phosphate tritt bei gleichzeitiger Anwesenheit von Säuren und Alkalien ein, so daß WRÓBLEWSKI (4) den Phosphaten eine schützende Eigenschaft zuschreibt. Und zwar sollen durch Neutralisation der zugesetzten Säuren und Alkalien durch die Phosphate letztere sozusagen die Regulatoren in der lebenden Zelle gegenüber den Angriffen der Säuren und Basen sein. Eine Ergänzung in dieser Frage bringen die neueren Untersuchungen von HARDEN und YOUNG (2). Hiernach läßt sich dem Preßsafte zugesetztes Alkaliphosphat nach der Gärung nicht mehr durch Magnesiamischung fällen, was auf Bildung einer organischen Phosphorsäureverbindung im Preßsafte hinweist. Nach Versuchen von BUCHNER und ANTONI (2) zeigt Zusatz von Lecithin einen großen Einfluß bei der Zymasegärung, so daß nach Ansicht dieser Forscher organische Phosphorsäureverbindungen als wirksames Prinzip gelten können.

Auf Zusatz von Nitriten zum Hefenpreßsaft tritt in diesem zufolge BUCHNER und RAPP (8) eine beträchtliche Stickstoffentbindung ein. Sie ist ein rein chemischer Vorgang, welcher seine Entstehung der Einwirkung der Aminosäuren und anderer Aminoverbindungen im Hefenpreßsafte auf die Nitrite verdankt. Die nämliche Beobachtung machte auch WRÓBLEWSKI (2). Er konstatierte außerdem, daß ein Zusatz von 0,25 Proz. Natriumnitrit die Gärtätigkeit im Preßsafte aufhebt.

Wenn schon der Saft an und für sich und weiterhin der hohe Zuckerzusatz entwicklungshemmend auf Mikroorganismen wirken mußte, so war trotzdem ein Zusatz von einem Antiseptikum bei den Preßsaftgärungen angezeigt. Sublimat verursacht im Hefenpreßsafte zufolge BUCHNER (8) starke Trübung und Vernichtung der Gärkraft; das gleiche tritt zufolge BUCHNER und ANTONI (1) mit Ammoniumfluorid und Natriumfluorid schon in 0,55-proz. Lösung ein. Natriumazoimid vermindert die Gärkraft in 0,36—0,71-proz. Lösung, während nach PALLADIN (1), nach GROMOW und GRIGORIEW (1), ferner nach BUCHNER und ANTONI (1) das Chininsulfat in 0,5-proz. Lösung die Gärung begünstigt.

Wie bekannt, wird die Wirksamkeit der meisten Enzyme durch Blausäure-Zusatz vorübergehend vollständig gehemmt, während sie nach dem mittelst Durchleiten von Luft erfolgten Verdrängen der Blausäure wieder auftritt, eine Beobachtung, die auch bei dem Enzyme der Alkoholgärung durch BUCHNER und RAPP (1) ihre Bestätigung fand. Besonders große Verwendung als Antiseptikum bei den Preßsaftgärungen fanden die Salze der arsenigen Säure (vergl. S. 135) in den Untersuchungen von BUCHNER und RAPP (1—4) allerdings nur bei den älteren

Versuchen. Abeles (1) hatte nämlich darauf aufmerksam gemacht, daß Stoffe, welche eine chemische Bindung mit den Eiweißkörpern des Hefenpreßsaftes direkt eingehen — eine Beobachtung, welche schon Biernacki (1) gemacht hatte, — ihre Rolle als Gifte gegenüber Mikro-
5 organismen verlieren, und daß 2 Proz. Natriumarsenit weder das Wachstum noch die Gärtätigkeit der Zellen hintanzuhalten vermögen, indem nach Festlegung des Arsenits immer noch ein Teil der Zellen lebensfähig bleibt. Auf Grund dieser Beobachtung wurde später von der Verwendung dieses Antiseptikums Abstand genommen, und zwar um so mehr,
10 als sich unregelmäßige Wirkungen in der Gärkraft unter gewissen Verhältnissen feststellen ließen. So tritt im Preßsafte bei 2 Proz. Arsenitzusatz keine Gärung ein, wenn die Hefe gelagert war, oder wenn der Preßsaft sei es dialysiert, sei es verdünnt wurde, oder endlich wenn Trockensaft (bei 35° C erhalten) verwendet wurde. Buchner und Rapp (7)
15 suchen dieses merkwürdige Verhalten auf das Verschwinden oder die Verminderung der hochmolekularen Eiweißkörper zurückzuführen, so daß demnach Eiweißstoffe einen gewissen Schutz gegenüber der schädlichen Arsenitwirkung darstellen, einen Schutz, den auch Zucker gewähren soll, wenn er gleichzeitig mit dem Arsenit oder bald nachher in großer Menge
20 zugesetzt wird. Bei einer Gabe von 5 Proz. Arsenit ist Gärvermögen im Safte nicht mehr zu beobachten.

Der Einfluß des Formaldehyds wurde von Wróblewski (2) untersucht, welcher bei 0.05 Proz. Zusatz nur noch sehr schwache Gärung eintreten sah, während Macfadyen, Morris und Rowland (1) bei 0.0005 Proz.
25 Zusatz günstige Beeinflussung konstatieren konnten. Buchner und Antoni (1) vermochten die Abnahme der Gärkraft bei Zusatz von 0.12 Proz. auf ein Fünftel und von 0.24 Proz. auf ein Drittel bis drei Fünftel für gärkräftige Säfte festzusetzen. Von Wróblewski (2) wurde auch der Einfluß von Hydroxylaminchlorhydrat untersucht und
30 gefunden, daß bei einem Zusatze von 0.65 Proz. die Gärtätigkeit des Preßsaftes im Erlöschen war.

Zu den Gärversuchen fanden ferner als Antiseptikum Chloroform, Thymol und Toluol ausgedehnte Anwendung (vergl. S. 139). Chloroform ist zwar auch brauchbar, läßt aber frühzeitig ein Auftreten
35 von geringen Eiweißausscheidungen erkennen. Als besser wurde Thymol und am besten Toluol befunden, welch letzteres auch von E. Fischer und P. Lindner (1) in ausgedehntem Maße verwendet worden ist. Thymol sowie Toluol besitzen genügend antiseptische Kraft. R. Albert (1) erkannte allerdings, daß bei Thymolzusatz höhere Gärkraftzahlen als bei
40 Anwendung von Toluol zu erhalten sind; später aber haben neue Versuche Buchner's (7) die Richtigkeit obiger Angaben bestätigt. Bei der Nachprüfung über den Einfluß der Antiseptika auf die Preßsaftgärung durch Macfadyen, Morris und Rowland (1) widersprechen sich die Ergebnisse bei Anwesenheit von Zucker so sehr, daß sie selbst in dieser
45 Beziehung noch weitere Forschungen als notwendig erachteten, die dann von Harden und Young (1) angestellt worden sind.

Zu den entwicklungshemmenden Agentien ist auch starker Zusatz von Glycerin und Rohrzucker zu zählen; denn lebende Organismen gehen in starker Glycerinlösung sehr bald zugrunde oder vermehren sich
50 darin wenigstens nicht weiter. Es war zufolge Buchner (8) bei einem Gesamt-Glycerin- oder Rohrzucker-Gehalte von 45 Proz. im Preßsafte noch lebhafte Gärung zu bemerken.

Auch der Einfluß verschiedener Zuckerkonzentrationen auf

den Verlauf der Preßsaftgärung möge an dieser Stelle berücksichtigt werden. Buchner und Rapp (7) fanden, daß die größte Menge von Kohlensäure im Hefenpreßsafte bei sehr starkem Zuckerzusatze (30 bis 40 Proz.) erhalten wurde. Umgekehrt muß man einen kleinen Zuckerzusatz (5—15 Proz.) wählen, wenn eine rasch einzusetzende Gärwirkung erzielt werden soll. Macfadyen, Morris und Rowland (1) gelangten zu entgegengesetzten Resultaten, die aber auch von Harden und Young (1) als irrtümlich bezeichnet werden.

Als Antiseptikum muß schließlich auch der Alkohol betrachtet werden. Er soll hier als solches und im Anschlusse daran als Fällungsmittel Erwähnung finden. Untersuchungen hierüber mit Preßsaft haben Herzog (1), Wróblewski (2) und Buchner und Antoni (1) ausgeführt. Ersterer und ebenso die beiden letztgenannten fanden, daß bei einem steigenden Alkoholzusatze zu gezuckertem Preßsafte die Gärwirkung allmählich abnimmt. Bei einem Zusatze von 15 Proz. war die Gärkraft des Preßsaftes noch nicht ganz erloschen, und es scheint die Grenze für die Alkoholbildung bei der zellfreien Gärung eher höher als bei der mit lebenden Hefenzellen zu liegen (s. auch S. 131). Nach den Untersuchungen von Wróblewski schwächt ein Alkoholzusatz von 10 Proz., und ein solcher von 20 Proz. hebt die Gärung auf.

Alkohol wird als Fällungsmittel bei Isolierung von Enzymen bekanntlich schon seit langem angewendet. Wenn schon bei beständigeren Enzymen (z. B. Invertase) eine längere Berührung des Enzyms mit dem Alkohol vermieden werden muß, so ist dieses bei dem viel mehr empfindlichen Enzyme der Alkoholgärung in erhöhtem Maße der Fall. Aus dem Preßsafte wird nach Angaben von Albert und Buchner (1) das gesamte gärungserregende Enzym ohne Verlust durch Alkohol gefällt, wenn man mindestens das 12-fache Volumen absoluten Alkohols oder besser eine Mischung von 800 ccm absoluten Alkohol und 400 ccm Aether auf 100 ccm Preßsaft verwendet, so schnell als möglich die Flüssigkeit absaugt, mit Aether nachwäscht und im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure trocknet. Das mitgefällte gärungserregende Enzym löst sich vollständig in Wasser bei Zusatz von 2,5—20 Proz. Glycerin. Am einfachsten suspendiert man die Fällung in dem Lösungsmittel, wenn man die Gärkraft des Niederschlages insgesamt erhalten will. Diese mittelst Wasser und Glycerin in Lösung gebrachten Anteile können durch Aether-Alkohol nochmals gefällt werden, ohne daß das Präparat wesentlich an Gärkraft Einbuße erleidet. Den Hauptbestandteil der Fällungen machen natürlich die Eiweißkörper aus, so daß vom Gewichte des Niederschlages nur ein verschwindend kleiner Teil auf das gärungserregende Enzym entfällt.

Bei Fällungen mit Methylalkohol (vergl. S. 133) wird die Gärkraft des Niederschlages auffallenderweise vollständig gestört. Aether allein erzeugt, wie Will (1) zuerst beobachtete, eine Gallerte, die reich an dem gärungserregenden Enzyme ist. Zur Fällung der Eiweißkörper des Preßsaftes wurden auch mit Aceton günstige Ergebnisse erhalten. Anfangs wurde vom Verfasser nur der Fehler gemacht, daß er eine zu geringe Quantität Aceton zur Fällung benutzte. Es muß nämlich mindestens das zehnfache Volumen genommen werden, wenn das gärungserregende Enzym vollständig ausgefällt werden soll. Nach den neueren Untersuchungen von Buchner und Antoni (2) mangelt es den Fällungen mit weniger Aceton an den zur vorzüglichen Gärung nötigen Phosphor-

säureverbindungen, und es wird durch steigenden Zusatz von Aceton nur jeweils der Salzgehalt des Niederschlags vermehrt ausgefällt.

Außer diesen eben erwähnten Mitteln wurde zur Fällung des gärungserregenden Enzyms im Preßsafte von Buchner (8) noch Ammoniumsulfat sowie Cholesterin nach der Methode von Brücke angewendet. Im ersteren Falle war überhaupt keine Gärung bemerkbar, und bei letzterem ließen sich auch nur Spuren einer solchen feststellen. Preßsaftfällungen wurden auch von Ahrens (1) mittelst Zinksulfat und Alkohol, von Wróblewski (2) mit Ammoniumsulfat ausgeführt. Beide aber prüften die Niederschläge nicht auf Gärkraft. Wróblewski fällte partiell aus und erhielt fünf Niederschläge und fünf Filtrate. Die, wie schon S. 352 erwähnt, bei verschiedenen Temperaturen koagulierbaren Eiweißstoffe werden bei jeder partiellen Fällung nur teilweise abgeschieden. R. Green (2) konnte schließlich gleichfalls konstatieren, daß mit den im Preßsafte erzeugten Niederschlägen zugleich auch das gärungserregende Enzym niedergerissen wird.

Im Anschlusse an die Fällungsversuche möge einiges über Untersuchungen, welche mit verdünntem Preßsafte ausgeführt wurden, berichtet werden. Wróblewski (4) kam zu dem Ergebnisse, daß durch Verdünnen des Saftes eine unerwartet große Schwächung der Gärkraft eintrat; ebenso fanden Macfadyen, Morris und Rowland (1), daß durch das gleiche Volumen Wasser die Selbstgärung des Preßsaftes merklich verzögert und durch das doppelte Volumen die Gasentwicklung so gut wie ganz aufgehoben wird. Als jedoch Buchner (7) dieses Verhalten genau untersuchte, kam er zu ganz anderen Ergebnissen: Selbst eine Verdünnung mit vier Volumen einer 9-proz. Zuckerlösung ergab keine nachweisbare Verminderung der Gärkraft; nur bei Verdünnung mit 2—3 Volumen Wasser war eine allmähliche Abnahme zu bemerken, die aber 20—25 Proz. der Gesamtmenge nicht überschritt. Buchner (8) konnte sogar noch in 25-facher Verdünnung des Saftes unter bestimmten Verhältnissen die Vergärung des Zuckers beobachten. Nach den neueren Untersuchungen von Harden und Young (1) ist auch die Wirkung des Verdünnens auf die Selbstgärung des aus obergäriger Hefe dargestellten Saftes sehr unbedeutend.

Eine Schädigung des gärungserregenden Enzyms findet durch Verdauungsenzyme statt. Wie schon erwähnt, nimmt die Gärkraft des Saftes beim Aufbewahren rasch ab, wofür die proteolytischen Enzyme des Saftes (s. d. 20. Kap.) verantwortlich gemacht wurden. Buchner und Rapp (1) haben nachgewiesen, daß mit Trypsin, Papajotin oder Pankreatin versetzter Hefenpreßsaft seine Gärkraft noch schneller verliert als die Kontrollprobe, und zwar entweder durch direkte Einwirkung der Verdauungsenzyme oder auch indirekt nach Spaltung der das gärungserregende Enzym schützenden, hochmolekularen Eiweißkörper.

Eine der wichtigsten Bedingungen bei den Untersuchungen über zellfreie Gärung war selbstverständlich, jede Tätigkeit von lebenden Organismen auszuschalten. H. Lange (1) untersuchte, inwieweit die im Rohsafte noch vorhandenen Hefenzellen beim Hervorbringen der Gärungserscheinungen von Belang sind, und fand, daß eine zehnmal größere Menge als die für gewöhnlich im Safte enthaltene nicht imstande war, auch nur eine annähernd so lebhafte Gärung in hoch konzentrierten Zuckerlösungen hervorzubringen. Zu dem nämlichen Resultate gelangte H. Will (2) bei der gleichen Nachprüfung. Von Buchner und Rapp (1) wurden absichtlich Zusätze von Hefenzellen und altem, bakterien-

haltigem Safte gemacht; jedoch die Gärwirkung übertraf in keinem Falle diejenige des frischen Saftes. Zu erwähnen ist, daß nach GERET's (1) und RAPP's (1) Untersuchungen die sterile Dauerhefe und somit jedenfalls auch die flüssigen Inhaltsstoffe der Hefe eine gewisse baktericide Kraft (s. Bd. V, S. 128—129) besitzen. 5

§ 83. Buchner's Zymase oder die Alkoholase.

ED. BUCHNER hat die Gärwirkung des Hefenpreßsaftes als Betätigung eines darin enthaltenen Enzyms erklärt, für welches er den Namen Zymase vorschlug. Dieselbe Bezeichnung hatte schon BÉCHAMP (1) im Jahre 1872 und zwar für jenes Enzym gebraucht, welches wir heute 10 gewöhnlich Invertase nennen. Bei anderen Forschern ist Zymase gleichbedeutend mit Hefenenzym im allgemeinen und überhaupt. Um dieser zu Mißverständnissen führenden Mehrdeutigkeit auszuweichen soll nun weiterhin für das Enzym der Alkoholgärung der von anderer Seite vorgeschlagene Name „Alkoholase" gebraucht werden. 15

Ueber die chemische Natur der Alkoholase läßt sich vorläufig nichts Bestimmtes sagen. Dieses Enzym macht nur einen verschwindend kleinen Bestandteil des Preßsaftes aus. Es soll zufolge WRÓBLEWSKI (4) ein kolloidaler Körper sein. Andere Tatsachen sprechen wieder für die Proteinnatur, und andere wieder deuten darauf hin, daß es mit den 20 morphotischen Elementen verbunden ist. Wir können nur aus der Untersuchung mit Preßsaft auf die Natur der Alkoholase schließen, da es bisher noch nicht gelungen ist, diese letztere selbst in reinem Zustande abzuscheiden. Ihre charakteristische Eigenschaft ist, daß sie gewisse Zuckerarten zu spalten vermag; vergl. BUCHNER und MEISENHEIMER (3). 25 Die Optimaltemperatur für ihre Gärwirkung ist 25—30° C. In trockenem Zustande ist ihre Haltbarkeit anscheinend eine gute. Sie vermag nicht durch die Zellmembran zu dialysieren. Beim Erhitzen geht sie unter gewissen Verhältnissen nicht zugrunde. Gegen chemische Agentien ist sie verschieden empfindlich. Säuren wirken schädlich, Alkalien dagegen, 30 in geringer Menge zugesetzt, nützlich. Gegen Alkohol ist sie empfindlich, weniger stark gegen Alkohol-Aether oder Aceton.

Außer dem Hefenpreßsaft besitzen wir noch ein anderes Hefenpräparat, welches sich zum Studium der Alkoholase und der anderen Enzyme der Hefe eignet, nämlich die sterile Dauerhefe. Der 35 Gärungstechniker versteht unter Dauerhefe gewöhnlich eine für länger dauernden Versand zubereitete Hefe. Die hier angeführte Dauerhefe hingegen darf also mit jener nicht verwechselt werden. Da es nicht jedem Forscher möglich sein dürfte, Hefenpreßsaft selbst oder in größeren Mengen herzustellen und an ihm weitere Untersuchungen über die Natur 40 der Alkoholase zu machen, so muß ein Präparat als bevorzugungswert erscheinen, dessen Herstellung jedem ohne besondere Hilfsmittel möglich ist und das sich zugleich auch langer Haltbarkeit erfreut. Außerdem bietet das Studium der Gärungserscheinungen mittelst Dauerhefe noch weitere Vorzüge gegenüber dem Preßsafte, indem der ganze Gehalt an 45 Alkoholase aus der präparierten Hefe gewonnen wird, insofern man mit der Technik der Darstellung vollkommen vertraut ist. Nur für einige Untersuchungen, z. B. bei der Extraktion von Alkoholase, ist die Anwesenheit der unverletzten Zellen störend: in diesen Fällen muß ein Oeffnen derselben durch Zerreiben mit oder ohne Sand vorangehen. 50

Die Methoden zur Darstellung von Dauerhefe (s. Bd. V, S. 129) gründen sich auf das Prinzip der Wasserentziehung entweder durch vorsichtiges Trocknen oder durch chemische Agentien, wie Alkohol-Aether nach R. Albert (3) oder Aceton nach Albert, Buchner und 5 Rapp (1). Die Wirkung bei den letzteren Verfahren hat man sich so vorzustellen, daß die genannten Mittel keine Plasmolyse herbeiführen, sondern durch die Zellmembran und die Schichten des Protoplasmas eindringen und durch Wasserentziehung alle chemischen Reaktionen zum Stillstande bringen.

10 Die aus untergäriger Bierhefe bereitete Acetondauerhefe, auch Zymin (s. Bd. V, S. 130) genannt, stellt ein fast weißes, staubtrockenes, vom praktischen Standpunkte aus beurteilt so gut wie steriles Pulver dar, mit 5,5—6,5 Proz. Wassergehalt. Das Gärvermögen entspricht für 2 g des Präparates, verteilt in 10 ccm Wasser mit 4 g Rohrzucker und 15 0,2 ccm Toluol als Antiseptikum, bei ca. 22° C nach 72 Stunden 0,96 bis 1,09 g Kohlensäure; die Gärkraft beträgt zufolge Albert, Buchner und Rapp (1) in den ersten 24 Stunden 0,40—0,49 g, in den nächsten 24 Stunden 0,36—0,45 g, in den dritten 24 Stunden 0,07—0,17 g, in den vierten 24 Stunden 0—0,02 g Kohlensäure. Gromow und Grigoriew (1) 20 fanden, daß nach Zusatz von frischem Zymin zu bereits erlahmtem von neuem Kohlensäure-Entwicklung eintritt, die aber viel größer ist, als wenn die beiden Mengen Zymin zusammen von Anfang an zur Gärung verwendet wurden. Folglich wird die Arbeit der neuen Zyminmenge durch die bereits vorhandenen Gärprodukte der ersten Zyminmenge ge-25 fördert. Die Herstellung von Acetondauerhefe ist patentgesetzlich geschützt. Sie kann von Anton Schroder in München, Landwehrstraße 45, bezogen werden. Acetondauerhefe hat in der Medizin Anwendung gefunden. Zu Backversuchen haben sie Komers und E. von Haunalter (1) und zum Zuckernachweise im Harne Münzer (1) benützt.

30 Die sterile Dauerhefe ist für weitere Studien über die Alkoholase geeignet. Es mögen daher noch eine Reihe von Fragen, z. B. über den Gehalt der Hefe an Alkoholase und die Bildung, Haltbarkeit, das Anreichern und die Isolierung dieses Enzymes, hier Erwähnung finden.

Von allen diesen Punkten muß uns der Gehalt und die Bildung 35 von Alkoholase in der Hefe am meisten interessieren. Zu solchen Untersuchungen hat sich ganz besonders die Dauerhefe als zweckdienend erwiesen, da es durch Präparierung von Hefe zu Dauerhefe möglich ist, den ganzen Gehalt an Alkoholase sowohl vor der Gärung als auch in jedem anderen Stadium zu fixieren. Daß der Gehalt an Alkoholase 40 in der Hefe je nach derem physiologischen Zustande ein schwankender ist, hatte die Beobachtung schon lange gelehrt. Will (1) drückt sich hierüber folgendermaßen aus: „Die Zymase ist ebenso wie das peptonisierende Enzym möglicherweise nur unter bestimmten Verhältnissen vorhanden. Es ist denkbar, daß die nach der Hauptgärung abgesetzte, mit 45 Reservestoffen angefüllte und in einem gewissen Ruhestande übergangene Hefe Zymase überhaupt nicht mehr oder nur in sehr geringer Menge enthält." Nach Lange (1) soll der Alkoholasegehalt in gewissem Grade von dem Stickstoffgehalte (s. S. 158) der Hefe abhängig sein, und dieser ist nach Hayduck (1) maßgebend für die Gärkraft der Hefe. Auch Green (2) 50 hat gefunden, daß die Alkoholasebildung intermittierend erfolgt. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der verschiedenen Forscher, die einen Preßsaft mit nur schwacher oder überhaupt ohne Gärkraft bekamen. In diesem Sinne muß auch das Verhalten der Hefe in der Praxis gedeutet

werden, wenn sie nach einer größeren Anzahl von Gärungen die Bierwürze nicht mehr normal vergärt. Aus all diesen Tatsachen ergibt sich unzweideutig, daß der Alkoholasegehalt der Hefe, und somit deren Gärkraft, nicht bloß je nach dem Charakter sondern auch je nach dem Alter der Hefe und verschiedenen anderen Umständen ein wechselnder sein 5 muß. Darauf wird bei weiteren Studien ein besonderes Augenmerk zu richten sein. Dies kann ja heute leicht geschehen, da wir durch Verarbeitung von Hefe zu Acetondauerhefe in jedem Stadium ein sicheres Mittel zur Hand haben, um sämtliche Vorgänge in der Zelle zu unterbrechen und zu fixieren. 10

Auf diese Weise wurde vorläufig der Gehalt der Hefe an Alkoholase während des Lagerns bei niederer Temperatur, während des Aufbewahrens unter Eiswasser und bei dem sogen. Regenerierungsverfahren verfolgt. Einer genaueren Betrachtung soll das Regenerierungsverfahren von HAYDUCK (2) unterzogen werden, das hier den für seine 15 Besprechung günstigsten Ort findet. Die Praxis der Brauerei hatte bis dahin nicht selten die Erfahrung gemacht, daß eine Hefe, wenn sie wiederholt verwendet wird, nach und nach immer weniger guten Bruch (s. Bd. V, S. 142 u. 207) herbeiführt und immer weniger feste Satzhefe (s. S. 121) liefert. Noch unbeeinflußt von der kurz zuvor durch E. CHR. 20 HANSEN gewonnenen Erkenntnis des Bestehens einer Vielheit von Hefenarten, von denen manche sich im Betriebe der Brauerei als Erreger von Biertrübung zu betätigen vermögen, meinte HAYDUCK (1) eine der Ursachen des Ausartens (Degenerierens, s. S. 166) der Bierhefe in einer durch die ihr gebotenen Lebensbedingungen bewirkten Ueberfütterung 25 mit stickstoffhaltiger Nahrung (s. S. 92) suchen zu müssen. Denn er hatte analytisch das Ansteigen des Stickstoffgehaltes des Trockenrückstandes bei wiederholter Durchführung einer Hefenart durch den Betrieb ständig verfolgt und festgestellt. Im Jahre 1884 versuchte er jenen schädlichen Ueberfluß dadurch hinabzudrücken, daß er die zu regene- 30 rierende Hefe bei höherer (gleichfalls die Vermehrung begünstigender) Temperatur, als es die des Brauereikellers ist, in einer kräftig gelüfteten Würze sich entwickeln ließ. Anstatt dieses Nährbodens hat HAYDUCK (2), angeregt durch den günstigen Erfolg der gleichgerichteten, aber unabhängig davon unternommenen Versuche eines ungenannten Praktikers, 35 dann eine (zwecks Verhütung von Bakterienwucherung) gehopfte, aufgekochte Zuckerlösung in Anwendung gebracht, welche bei kräftiger Lüftung eine an Stickstoff verhältnismäßig noch ärmere Ernte erzielen ließ. Daß ein in dem zu bessernden Zeuge vorhandener Gehalt an Krankheitshefen durch derartige Behandlung in dem einen oder anderen 40 Falle vielleicht sogar noch gesteigert, gewiß aber nicht vollständig ausgeschaltet werden kann, braucht heute, wo wir genaueren Einblick in das Wesen der Störungen des Gärbildes haben, als es HAYDUCK damals möglich war, wohl nicht erst betont zu werden. Das Verfahren ist auch nicht zu weiterer praktischer Verwertung gelangt. Doch mußte seiner 45 Erwähnung geschehen. Denn wenn es, wie angedeutet, ab und zu einmal ein sehr unerwünschtes Ergebnis hervorbringen wird und also als unverläßlich, ja sogar als grundsätzlich verfehlt bezeichnet werden muß, so ist daran doch die Tatsache beachtenswert, daß eine derart behandelte Hefe als viel wirkungskräftiger, gärtüchtiger sich erweist, als sie 50 es vor dieser Wiederbelebung war. R. ALBERT (2) hat dies durch Darstellung und Wirkungsvergleichung der Preßsäfte von Proben vor und nach solcher Behandlung bestätigen können. ED. BUCHNER und ALB.

Spitta (1) vermochten bei einer Nachprüfung, wobei Acetondauerhefe statt des Preßsaftes mit Vorteil Verwendung fand, diese Ergebnisse weiter zu bekräftigen. Alle diese Untersuchungen haben wahrscheinlich gemacht, daß im Augenblicke höchster Schaumbildung der Alkoholase-
5 vorrat in den Hefenzellen ein verhältnismäßig geringer ist. Die Alkoholase wird also offenbar nicht aufgespeichert, sondern wieder zerstört. Nach dem Lagern der Hefe bei 0° C ist die Gärkraft innerhalb $3^1/_2$ Stunden um 21 Proz., innerhalb 20 Stunden um 17 Proz. gestiegen. Die Forschung hat ferner ergeben, daß innerhalb 24 Stunden unter Eiswasser
10 gehaltene Hefe weder eine Neubildung noch eine Zerstörung des Alkoholasegehaltes aufweist.

Regenerierte Hefe ist nach Ed. Buchner (8) nicht solche, welche viel Alkoholase vorrätig enthält, sondern solche, welche dieses Enzym schnell zu bilden vermag. Ist die Gärkraft der angewandten
15 Hefe von vornherein eine sehr gute, so kann auch durch Regenerieren und Lagern kaum mehr eine Steigerung erzielt werden. Gegenüber Anwendung von 8-proz. Zuckerlösung beim Regenerieren wurde mit 20-proz. kein besonders gutes Produkt erhalten. Durch Zusatz von 1 Proz. Asparagin zu stickstofffreier Hayduck'scher Lösung trat im
20 Gegenteil eine geringe Herabminderung des Alkoholasegehaltes bei der regenerierten Hefe ein, beim darauffolgenden Lagern aber auch kein Ansteigen desselben. Nach den neuen Versuchen von Lange (2) gelingt es aber doch, die Gärwirkung des Hefenpreßsaftes bis auf das Neunfache zu steigern, wenn man die Hefe vor der Zerreibung in einer
25 hauptsächlich mit Asparagin versetzten Rohrzuckerlösung liegen läßt. Das Asparagin muß demnach die Bildung von Alkoholase in den lebenden Zellen begünstigen. Weitere Versuche wären in diesen Punkten überhaupt noch sehr erwünscht.

Während die Untersuchungen mit Hefenpreßsaft die Haltbarkeit
30 der Alkoholase als sehr gering erkennen ließen, wurde an ganz besonders gut getrocknetem Hefenpreßsaft nach 12 Monaten keine nachweisbare Abnahme der Gärkraft beobachtet (s. S. 354), ein Resultat, das sich zufolge Albert, Buchner und Rapp (1) auch bei Acetondauerhefe ergab, deren Gärkraft, wenn jene in gut schließenden Glasstopfengläsern
35 bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurde, nach halbjährigem Lagern nur 10—19 Proz. eingebüßt hatte. Wahrscheinlich ist durch Herabsetzung des Wassergehaltes eine Verminderung der Gärkraft noch mehr hintanzuhalten.

Die Herabminderung der Gärkraft schreibt Buchner (4) der stören-
40 den Einwirkung von Endotryptase zu, welche unter gewissen Bedingungen in den Hefenzellen vermehrt entstehen, eventuell aber auch wieder verschwinden kann. Anscheinend ist höhere Temperatur zur Entwicklung und Wirkung dieses Enzyms günstig. Eine Trennung von Alkoholase und Endotryptase war bisher nicht möglich, da
45 alle Einwirkungen vermutlich zugleich zugunsten und zu ungunsten beider Enzyme sich geltend machen, weshalb auch eine einwandsfreie Beantwortung mancher Punkte bislang ausgeschlossen ist. A. Harden (1) konstatierte eine Verstärkung der Gärkraft des Preßsaftes bei Gegenwart von Serum und hiermit einen verzögernden Einfluß auf die Endo-
50 tryptase (vergl. auch die Angaben über Chininsulfat auf S. 357).

Eine sehr wichtige Frage ist diejenige der Isolierung der Alkoholase. Wenn wir bedenken, daß eine wirkliche Isolierung bei anderen Enzymen bisher noch nicht ausgeführt wurde, so dürfte sich

angesichts der kurzen Zeit, die seit der Entdeckung verstrichen ist, wohl noch keine befriedigende Lösung dieses Problems erwarten lassen. Trotzdem sind immerhin Fortschritte hierin zu konstatieren, namentlich in Rücksicht darauf, daß man es ja mit einem ganz labilen Stoffe zu tun hat. Von diesen Untersuchungen mag zunächst hervorgehoben werden, 5 daß es AHRENS (1) gelungen ist, durch Ausfrieren des Wassers die Gärkraft des Preßsaftes zu steigern. Weiter gehören hierher die Fällungsversuche mit Alkohol, besonders aber mit Alkohol-Aether oder mit Aceton. AHRENS (1) hat den Preßsaft bis auf — 2° C abgekühlt. Der entstandene Eisbrei bestand hauptsächlich aus reinem Wasser und konnte 10 von den flüssigen Bestandteilen getrennt werden. Durch solche wiederholte Behandlungen erhielt dieser Forscher einen gärkräftigeren Saft. MEISENHEIMER (1) fand bei der Nachprüfung eine Gärkraftzunahme von ca. 48 Proz. bei der untersten (5.) Schicht. Die Fällungen von Preßsaft mit Alkohol-Aether oder mit Aceton sind schon auf S. 359 er- 15 wähnt worden; es ist hier zu wiederholen, daß eine Anreicherung an Alkoholase damit nicht erzielt wurde, da sämtliche Eiweißkörper mit der Alkoholase ausfallen. Es bestand nur noch die Frage, ob vielleicht fraktionierte Fällungen zum Ziele führen. Nach Untersuchungen von ALBERT und BUCHNER (1) wird durch weniger Alkohol zwar die größte 20 Menge der Eiweißkörper, zugleich aber auch das Enzym mit ausgefällt; der zweite, mit mehr Alkohol erhaltene Niederschlag besitzt keine Gärkraft mehr. Derartige Versuche werden dadurch sehr ungünstig beeinflußt, daß die Niederschläge nur langsam in Wasser sich lösen. Allerdings kann durch Zusatz von Glycerin die Lösung schneller erreicht 25 werden, aber eine zweite Fällung dieser Lösung ergibt insofern geringe Vorteile, als alle Beimengungen wieder mitausgeschieden werden, das Enzym also nicht konzentrierter zu erhalten ist. Ganz ähnlich verhält es sich, wenn wir Aceton als Fällungsmittel benützen. Bessere Aussichten versprachen die Versuche von R. ALBERT (3) zu ergeben, welche 30 mit Auszügen von steriler Dauerhefe angestellt wurden. Da bei dieser die Zellmembran noch vorhanden und unter solchen Verhältnissen das Enzym nicht ohne weiteres zu extrahieren ist, so mußte eine Zerstörung der Zellwände und des geronnenen Protoplasmaschlauches vorausgehen, bevor an ein Ausziehen mit Glycerin und Wasser gegangen werden 35 konnte. R. ALBERT (3) läßt deshalb 50 g Dauerhefe mit 100 g Quarzsand zuerst trocken, dann mit 100 ccm Wasser angefeuchtet verreiben. Die Flüssigkeit wird von den festen Bestandteilen mittelst hydraulischer Presse oder Nutsche getrennt. Aus der Lösung von 50 g Dauerhefe erhält man nach der darauf folgenden Fällung mit Alkohol-Aether 2—3 g 40 gelbweißes Pulver, das im Gegensatze zu den Preßsaftfällungen sich leicht auflöst und aus Lösungen wiederholt gefällt werden kann, ohne an Gärkraft einzubüßen. Zu diesen Versuchen ist nur zu bemerken, daß das Zerreiben von Dauerhefe mit Quarzsand nicht unbedenklich ist. Durch 10 Minuten langes trockenes Zerreiben nimmt nämlich 45 die Gärkraft merklich ab. Vielleicht ist dennoch auf diesem Wege ein weiterer Fortschritt zur Isolierung der Alkoholase zu erreichen, besonders dann, wenn durch Zerreiben ohne Quarzsand die Abnahme der Gärkraft noch mehr hintangehalten wird und wenn anstatt Gemische von Alkohol und Aether solche von Aceton und Aether oder andere un- 50 schädliche Fällungsmittel Verwendung finden, vorausgesetzt, daß man keine allzugroßen Anforderungen an die Reinheit des zu erhaltenden Präparates macht.

Zugleich mit dem Nachweise, daß das gärungserregende Enzym nicht aus steriler Dauerhefe extrahiert werden kann, ohne daß vorher die Zelle mechanisch zerrissen wird, ist der sichere Beweis geliefert, daß die Gärung innerhalb der Hefenzellen und nicht außerhalb 5 derselben stattfindet. Dies geht übrigens auch daraus hervor, daß die Alkoholase nicht zu dialysieren vermag und daß Glycogen durch Bierhefe nur nach dem Zerreißen der Hefenzellmembran vergoren wird. Die Alkoholase ist eben ein Endoenzym (s. Bd. I, S. 267).

§ 84. Die Stellung der Alkoholase zu den anderen Enzymen.

10 Vor Eintritt in die Kennzeichnung der Stellung der Alkoholase zu den anderen Enzymen soll noch der Erörterungen gedacht werden, die sich an die Entdeckung jenes Enzyms geknüpft haben. Solange es nicht möglich war, das gärungserregende Enzym von den lebenden Hefenzellen abzusondern, war es begreiflich, daß unter den Gelehrten 15 Meinung gegen Meinung stand. Die Trennung des Alkoholenzyms vom Lebensprozesse erfolgte, eine experimentelle Lösung des so wichtigen Problems wurde gegeben, alle die falschen Nachprüfungen wurden später widerrufen, und nun begannen die Zweifler andere Einwände in den Vordergrund zu stellen. Anfangs versuchte man die Gärung auf die 20 noch im Safte vorhandenen Mikroorganismen zurückzuführen. Da aber zu allen Zellsaftgärungen stets wirksame Antiseptika beigegeben wurden und außerdem Lange (1) nachgewiesen hatte, daß sogar die zehnfache Menge der im Rohsafte gefundenen Hefenzellen nicht annähernd so lebhafte Gärung wie jener hervorrufen könnte, so mußte dieser Einwand 25 verstummen. Von anderer Seite wurde die Anschauung vertreten, daß die Kohlensäure-Entwicklung durch Abspaltung aus dem Plasma oder durch andere Vorgänge bedingt sei. Eine weitere Ansicht, die bald in den Vordergrund trat und eine große Anzahl von Anhängern fand, war die, daß die Gärung durch die noch vorhandenen winzig kleinen lebenden 30 Plasmateilchen im Preßsafte vollzogen werde, übrigens eine Auffassung, welche in der Enzymlehre durchaus nicht neu ist. Während nun Kupfer und Voit (1) gleich, nachdem diese Entdeckung zutage getreten war, sich dahin aussprachen, daß möglicherweise Teile des Protoplasmas die Gärung verursachen könnten, stellte Abeles (1) diese 35 Auffassung als völlig sicher hin, nachdem er einige Beweise zugunsten der Plasmahypothese erbracht hatte. Ihm schlossen sich Macfadyen, Morris und Rowland (1), Beijerinck (2), Wehmer (1), Behrens (1), C. J. Lintner (2), Soxhlet (1), Iwanowski und Obrastzow (1) und H. Fischer (1 u. 2) an. Für die reine Enzymtheorie dagegen sprachen sich in der 40 Literatur Duclaux (2), R. Green (3), Rey-Pailhade (1), Pfeffer (1), A. Richter (1) und A. J. J. Vandevelde (1) aus.

Nur auf die Ansichten von Abeles und von Macfadyen, Morris und Rowland soll hier eingegangen werden. Abeles (1) sagt: „Die Gärkraft ist vielmehr an die totale im Hefenpreßsafte gelöste oder rich- 45 tiger suspendierte organische Masse gebunden." Albert und Buchner (1) zeigten dagegen, daß ein aus dem Preßsaft gefällter Anteil, wenn er wieder in Lösung gebracht wurde, noch Gärkraft besitzt. Wenn zugunsten von Abeles' Plasmatheorie entgegengehalten wird, daß trotz der Plasmagifte Hefenvermehrung eintritt, so weist Abeles 50 ganz richtig darauf hin, daß die Giftwirkung auf geformte Fermente

nicht allein von der Giftkonzentration sondern in noch höherem Maße von dem Mengenverhältnisse zwischen Protoplasma und Gift abhängig ist. Durch exakte Versuche wurde von Buchner und Rapp (6) nachgewiesen, daß Antiseptika, wie Toluol und Chloroform, welche also nicht direkt in chemische Bindung mit den Eiweißkörpern des Preßsaftes treten, die Gärung auch einer großen Menge von lebender Hefe unterdrücken, und daß die unter solchen Umständen auftretenden Kohlensäure-Mengen nur durch die von Abeles nicht berücksichtigten Quantitäten von vorrätiger Alkoholase erhalten werden. Ferner erklärte Abeles, daß nach dem Eintrocknen und selbst nach mehrstündigem Erhitzen auf 100° C Gärwirkung besonders von den jungen Zellen auf Zuckerlösung (wie Wiesner vor 30 Jahren bemerkt hat) erfolgt und daß sie fortpflanzungsfähig bleiben. Buchner hat bei seinen Erhitzungsversuchen immer direkt festgestellt, daß die Hefenzellen nach dem Erhitzen tot sind. **Macfadyen, Morris und Rowland (1) sowie Wróblewski (4)** fanden, daß bei doppelter Verdünnung des Preßsaftes die Gärkraft praktisch aufgehoben wird, und meinen, daß dies mit dem allgemeinen Verhalten der Enzyme unter denselben Bedingungen in so großem Widerspruche stehe, daß hiemit ein schwerwiegender Einwand gegenüber der von Buchner angenommenen Enzymtheorie vorhanden sei. Wie aber schon auf S. 360 erwähnt worden ist, haben die von Buchner (7) und neuerdings von Harden und Young (1) ausgeführten Versuche ein solches Resultat nicht ergeben. Schließlich mögen noch einige physiologische Gründe zu ungunsten der Plasmatheorie angeführt werden. Unverständlich wäre z. B. bei Annahme der Plasmahypothese, daß aus sehr lebenskräftiger Hefe, obwohl doch die nämlichen hypothetischen Plasmateilchen in dem Safte enthalten sind, in manchen Fällen ein gärunwirksamer Preßsaft erhalten wurde, daß ferner nach R. Albert (2), Buchner und Spitta (1) und Lange (2) eine Anreicherung an gärungserregendem Enzyme möglich ist; eine Veränderung des Gesamtprotoplasmas ist hierbei doch wohl nicht anzunehmen.

Aus all den angeführten Tatsachen, sowie dem Verhalten des Hefenpreßsaftes gegenüber Toluol und 40-proz. Zuckerlösung, beim Centrifugieren, beim Filtrieren durch Chamberlandfilter, beim Eintrocknen, Aufbewahren, Erhitzen, Fällen des Preßsaftes, Ausziehen der Fällung und Ausziehen von abgetöteter Dauerhefe mit Glycerin und Wasser, sowie Wiederfällen dieser Lösung schließt Buchner mit Recht, daß im Preßsafte kein lebendes Agens vorhanden ist. Hält man aber trotzdem an dieser Vorstellung fest, so müßte man unbedingt das Leben anders definieren als bisher, was jedoch wohl zu einem nutzlosen Wortstreite führen würde. Tatsache ist, daß wir im Preßsafte selbst kein Ganzes der Zelle mehr haben, sondern einen von seiner Zellmembran und anderen, unlöslichen Bestandteilen befreiten Zellinhalt, also ein Produkt, das nur einen Teil der früheren lebenden Zellen ausmacht. Daß nun von der lebenden Sproßpilzzelle losgetrennte Teile, welche unter keinerlei Bedingungen Wachstumserscheinungen zeigen, unter Umständen sogar sehr lange Zeit weiter leben sollten, diese Annahme ist neu und höchst unwahrscheinlich. Wie sicher lautet dagegen die mit allen bis jetzt gemachten Erfahrungen und Beobachtungen übereinstimmende Behauptung, daß diese losgetrennten, löslichen Bestandteile der Zelle ihre Wirkungsfähigkeit beibehalten haben und unter Umständen auch entfalten können. Erwiesen ist ferner, daß das gärungserregende Agens nur einen verschwindend kleinen Teil der losgelösten Zellsubstanz aus-

macht, daß es in Wasser löslich ist, daß es aus Dauerhefe nach dem Zerreiben ausgezogen, gefällt, wieder gelöst und aufs neue gefällt werden kann, Eigenschaften, die wir noch nie vorher vom lebenden Protoplasma angenommen hatten.

Eine Vergleichung der Alkoholase mit anderen Enzymen möge nunmehr angeschlossen werden. Zunächst müssen wir uns daran erinnern, daß alle bis jetzt bekannten Enzyme in ihren Eigenschaften größere oder geringere Schwankungen aufweisen. So darf es uns denn keineswegs wundernehmen, wenn die labilere Alkoholase in gar mancher Hinsicht gegenüber den anderen bekannten Enzymen Unterschiede aufweist, die uns also nicht berechtigen, ihr den Charakter eines Enzyms abzusprechen. Die Alkoholase besitzt die gleichen Eigenschaften wie die übrigen Enzyme, so die Löslichkeit in reinem oder glycerinhaltigem Wasser, die Fällbarkeit durch Alkohol, Aether, Aceton und die Eigenschaft, mit erzeugten Niederschlägen (Calciumphosphat, Eiweißfällungen) mit ausgefällt zu werden, und endlich die Beeinflußbarkeit durch chemische Agentien und Protoplasmagifte. Unterschiede zeigen sich, zum Teile in ihrem Vermögen, nur schwer, oder nur unter gewissen Bedingungen oder gar nicht zu dialysieren, in ihrer großen Empfindlichkeit gegenüber höheren Temperaturen, allerdings viel weniger im trockenen als im gelösten Zustande, obwohl sie hierin der Urease und dem invertierenden Enzyme der *Monilia candida* gleicht, ferner in dem nur zeitenweisen Auftreten des Enzyms in der lebenden Zelle, wofür jedoch Analogien im Pflanzenreiche existieren. Ein größerer Unterschied besteht nur in der bei ihr viel größeren Wärmebildung und in dem langsameren Vorgange der Enzymwirkung. Neumeister (1) hielt deshalb an der Ansicht fest, daß es sich um ein Zusammenwirken von verschiedenen Stoffen aus der lebenden Zelle handle, die in der ihnen im Protoplasma eigentümlichen Wechselwirkung verharrten.

Nach diesem Vergleiche drängt sich uns die Frage auf, welcher Untergruppe von Enzymen die Alkoholase zugeteilt werden muß, und ob die Alkoholase nicht etwa als Zymogen (s. Bd. I, S. 269) in der Hefe vorhanden ist. Buchner (8) schlägt vor, die Alkoholase als Vertreter einer neuen Untergruppe (der Gärungsenzyme) der großen Klasse von Enzymen anzufügen. Duclaux (3) reiht sie in die Gruppe der Ernährungsenzyme ein. Wróblewski (4) rechnet sie zur dritten Gruppe der Katalysatoren (s. Bd. I, S. 264), welche den morphologischen Bestandteilen des Protoplasmas sehr nahe stehen. Ed. Buchner nimmt in der Hefenzelle kein Zymogen an. Wróblewski (4) spricht sich dagegen teilweise zugunsten des Bestehens eines solchen aus.

Das Verfahren der Darstellung von steriler Dauerhefe läßt sich mit Vorteil auf andere Gärungserreger übertragen. Auf diese Weise haben E. Buchner und J. Meisenheimer (1 u. 2) die Enzyme bei Spaltpilzgärungen, und zwar bei der Milchsäure- und der Essigsäuregärung, dann von *Monilia candida* und einer Milchzuckerhefe, ferner F. Rothenbach und L. Eberlein (1) die von *Bacterium Pasteurianum* studiert. In all diesen Fällen konnte mit solchen sterilen Präparaten Gärungen bezw. die Bildung der entsprechenden Säuren nachgewiesen werden. Aber auch bei höheren Pflanzen kann diese Methode besonders dann, wenn man mit labilen Enzymen rechnen muß, Anwendung finden. Stoklasa, Jelínek und Vítek (1) und Stoklasa und Šimáček (1) haben in Zuckerrüben, Erbsensamen, Kartoffeln, Blüten, Fleisch, Lunge, und ebenso Marpmann (1) im Honig, Šimáček (1) in Pankreas, Arnheim und

Rosenbaum (1) in Pankreas, Muskel und Leber ein der Alkoholase ähnliches Enzym nachgewiesen. Mit Vorliebe wird vielfach die lebende Hefe zu Enzymfragen, welche allgemeiner Natur sind, herangezogen. Selbst für solche Forschungen dürfte sich das neue Präparat Zymin (s. S. 362) eignen, da wir mit einem längere Zeit haltbaren und genau 5 und bequem wägbaren Stoffe von bestimmter Gärkraft rechnen können. Solche Versuche mit Zymin sind bereits von Palladin (1), Telesnin (1) Gromow und Grigoriew (1), Herzog (3) und Euler (1) angestellt worden.

Literatur

zum Kapitel Die Alkoholase.

*Abeles, Hans, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1898, Bd. 31, S. 2261. *Ahrens, Felix B., (1) Zeitschr. f. angewandte Chemie, 1900, Bd. 14, S. 483. *Albert, Robert, (1) W. f. Brauerei, 1899, Bd. 16, S. 485. — (2) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1899, Bd. 32, S. 2372. — (3) Ebenda, 1900, Bd. 33, S. 3775. *Albert, R., und Buchner, Ed., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1900, Bd. 33, S. 266 u. 971. *Albert, R., Buchner, Ed., und Rapp, R., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1902, Bd. 35, S. 2376. *Arnheim, J., und Rosenbaum, J., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1903, Bd. 40, S. 220. *Béchamp, A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1872, Bd. 74, S. 184. *Behrens, Joh., (1) Bot. Ztg., 1901, 2. Abt., Bd. 59, S. 4. *Beijerinck, M. W., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1897, Bd. 3, S. 454. — (2) Ebenda, 1900, Bd. 6, S. 11, Anm. *Berthelot, M., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1857, Bd. 44, S. 702. — (2) Chimie organique, fondée sur la synthèse. Paris 1860, Bd. 2, S. 621. — (3) Ann. de chim. et de phys., 1865, 4. sér., Bd. 6, S. 329 u. 399. *Biernacki, E., (1) Pflügers Archiv, 1891, Bd. 39, S. 112. *Bouffard, A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1895, Bd. 121, S. 357. *Brefeld, Oskar, (1) Landw. Jahrbücher, 1874, Bd. 3, S. 65. *Brown, Adr. J., (1) J. federated Inst. Brewing, 1901, Bd. 7, S. 93. *Buchner, Eduard, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1897, Bd. 30, S. 117. — (2) D.R.P. 99508 v. 12./1. 1897. — (3) D.R.P. 97240 v. 30./4. 1897. — (4) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1897, Bd. 30, S. 1110. — (5) Ebenda, 1900, Bd. 33, S. 3307. — (6) Ebenda, S. 3311. — (7) W. f. Brauerei, 1901, Bd. 18, S. 197. — (8) Zymasegärung. München u. Berlin 1903. *Buchner, Ed., und Antoni, W., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1905, Bd. 44, S. 206. — (2) Ebenda, 1905, Bd. 46, S. 136. *Buchner, Ed., und Meisenheimer, J., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1903, Bd. 36, S. 634. — (2) Z. f. physiolog. Chem., 1903, Bd. 40, S. 167. — (3) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1905, Bd. 38, S. 620. *Buchner, Ed., und Rapp, R., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1897, Bd. 30, S. 2668. — (2) Ebenda, 1898, Bd. 31, S. 209. — (3) Ebenda, S. 1084. — (4) Ebenda, S. 1090. — (5) Ebenda, S. 1531. — (6) Ebenda, 1899, Bd. 32, S. 127. — (7) Ebenda, S. 2086. — (8) Ebenda, 1901, Bd. 34, S. 1523. *Buchner, Ed., und Spitta, A., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1902, Bd. 35, S. 1703. *Buchner, Hans, und Gruber, Max, (1) D.R.P. 113181 v. 24. 6. 1899. *Cagniard-Latour, Ch., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1837, Bd. 4, S. 905. *Cohnheim, (1) Z. f. physiolog. Chem., 1903, Bd. 39, S. 336. *Colin, (1) Ann. de chim. et de phys., 1824, Bd. 28, S. 128; Bd. 30, S. 42. *Czapek, F., (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1899, Bd. 17, S. 166. *Delbrück, Max, (1) W. f. Brauerei, 1897, Bd. 14, S. 363. — (2) Ebenda, 1898, Bd. 15, S. 650. *Dormeyer, C., (1) W. f. Brauerei, 1899, Bd. 16, S. 557. *Duclaux, E. P., (1) Ann. Pasteur, 1896, Bd. 10, S. 119. — (2) Traité de Microbiologie. Paris 1898. — (3) Journ. de la Brasserie, 1900; ref. in Chem. Centralbl., 1900, Bd. II, S. 54. *Dumas, J. B., (1) Ann. de chim. et de phys., 1874, 5. sér., Bd. 3, S. 57. *Euler, H., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1905, Bd. 44, S. 53. *Fiechter, (1) Wirkung d. Blausäure auf Fermente. Dissert., Basel 1875. *Fischer, Emil (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1891, Bd. 24, S. 1836. — (2) W. f. Brauerei, 1897, Bd. 14, S. 363. *Fischer, Emil, und Lindner, Paul, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1895, Bd. 28, S. 3034. *Fischer, Hugo, (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 9, S. 353 u. 385. — (2) Ebenda, 1903, Bd. 10, S. 452. *Fitz, Albert, (1) Annalen der Oenologie, 1872, Bd. 2, S. 428. *Fleck, H., (1) Ber. d. Chem. Centralstelle f. öff. Gesundheitspflege zu Dresden, 1876. *Flügge, C., und Sirotinin, (1) Z. f. Hyg., 1888, Bd. 4, S. 208 u. 262. *Geret, L., (1) Münch. med. Wochenschrift, 1901, Bd. 48, S. 1836. *Green, J. R., (1) Annals of Botany, 1897, Bd. 11, S. 535. — (2) Ebenda, 1898, Bd. 12, S. 491. — (3) Die Enzyme. Deutsch v. Windisch. Berlin 1901. *Gromow, T., und Grigoriew, O., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1904, Bd. 42, S. 299. *Hagenmüller, (1) Chem.-Ztg., 1902, Bd. 26, S. 209. *Hahn, Martin, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1900, Bd. 33, S. 3555. *Hahn, M., und Geret, L., (1) Z. f. Biologie, 1900, Bd. 40, S. 117. *Harden, A., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1903, Bd. 36, S. 715. *Harden, A., und Young, W. J., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1904, Bd. 37, S. 1052. — (2) Journ. of Physiology, 1905, Bd. 32, Nr. 1. — (3)

Proceedings Chem. Soc., 1905, Bd. 21, Nr. 297, S. 189. ***Hayduck,** M., (1) W. f. Brauerei, 1884, Bd. 1, S. 345. — (2) Ebenda, S. 697. ***Helmholtz,** H., (1) Müllers Archiv, 1843, Bd. 10, S. 453. ***Herzog,** R. O., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1903, Bd. 37, S. 149. — (2) Ebenda, S. 383. — (3) Ebenda, S. 381. ***Hoppe-Seyler,** F., (1) Pflügers Archiv, 1876, Bd. 12, S. 5 u. 9. ***Iwanowski,** D., und **Obrastzow,** S., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1901, Bd. 7, S. 305. ***Klason,** (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1898, Bd. 21, S. 632. ***Komers,** K., und **Haunalter,** E. **von,** (1) Zeitschrift f. d. landw. Versuchswesen in Oesterreich, 1902, Bd. 5, S. 1225. ***Kohnstamm,** Ph., (1) Bot. Centralbl., 1901, Bd. 10, Beiheft 2, S. 91. ***Krasnosselsky,** T., (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1905, Bd. 23, S. 142. ***Kupfer** und **Voit,** (1) Münch. med. Wochenschrift, 1897, Bd. 44, S. 321. ***van Laer,** H., (1) D.R.P. 117303 v. 29./12. 1898; ref. in Chem. Centralblatt, 1901, Bd. I, S. 352. ***Lange,** H., (1) W. f. Brauerei, 1898, Bd. 15, S. 877. — (2) Jahrbuch d. Versuchs- u. Lehranstalt f. Brauerei in Berlin, 1904, Bd. 7, S. 43. ***Liebig,** J., (1) Liebigs Ann., 1839, Bd. 29, S. 100. — (2) Ebenda, 1870, Bd. 153, S. 1 u. 137. ***Lintner,** C. J., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1899, Bd. 5, S. 793. — (2) Chem.-Ztg., 1899, Bd. 23, S. 851. ***Lüdersdorff,** (1) Poggendorffs Ann., 1846, Bd. 67, S. 408. ***Macfadyen,** A., **Morris,** G. H., und **Rowland,** S., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1900, Bd. 33, S. 2764. ***Manassëin,** Maria **von,** (1) In: Mikroskopische Untersuchungen, herausgeg. v. J. Wiesner. Stuttgart 1872, S. 116. ***Marpmann,** (1) Pharmac. Ztg., 1903, Bd. 47, S. 1010. ***Martin,** C. J., (1) Journ. of Physiology, 1896, Bd. 20, S. 364. ***Martin,** C. J., und **Chapman,** (1) Proc. of the Physiological Soc., 1898, 11. Juni. ***Maximow,** N. A., (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1904, Bd. 22, S. 225. ***Mazé,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1902, Bd. 135, S. 113. — (2) Ebenda, 1904, Bd. 138, S. 1514. ***Meisenheimer,** J., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1903, Bd. 37, S. 518. ***Meulemeester,** E. **de,** (1) D.R.P. 105626 v. 30. 4. 1898. ***Miquel,** P., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1890, Bd. 111, S. 397. ***Mitscherlich,** E., (1) Monatsberichte d. Kgl. Akad. d. Wiss. zu Berlin, 1841, S. 392. ***Münzer,** (1) Münch. med. Wochenschrift, 1903, Bd. 50, S. 1949. ***Neumeister,** R., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1897, Bd. 30, S. 2963. ***Palladin,** W. J., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 13, S. 353. ***Pasteur,** L., (1) Cit. n. Roux (1). ***Pfeffer,** W., (1) Verhdlg. d. Ges. Deutsch. Naturf. u. Aerzte, 1899, Bd. 2, 1. Hälfte, S. 210. ***Rapp,** R., (1) Münch. med. Wochenschrift, 1902, Bd. 49, S. 1494. ***Rey-Pailhade,** J. **de,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1894, Bd. 118, S. 201. ***Richter,** Andreas, (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 787. ***Rothenbach,** F., und **Eberlein,** L., (1) Die Deutsche Essigindustrie, 1905, Bd. 9, S. 233. ***Roux,** P. E., (1) Ann. de la Brasserie et de la Distillerie, Paris, 1898, Bd. 1, S. 512. ***Rubner,** M., (1) Arch. f. Hyg., 1903, Bd. 48, S. 260. — (2) Ebenda, 1904, Bd. 49, S. 355. ***Schmidt,** C., (1) Liebigs Ann., 1847, Bd. 61, S. 171. ***Schunck,** E., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1898, Bd. 31, S. 309. ***Schwann,** Th., (1) Poggendorffs Ann., 1837, Bd. 41, S. 184. ***Simáček,** E., (1) Centralbl. f. Physiologie, 1903, Bd. 17, S. 477. ***Soxhlet,** (1) Chem.-Ztg., 1899, Bd. 23, S. 851. ***Stavenhagen,** A., (1) Ber. d. Deutsch Chem. Ges., 1897, Bd. 30, S. 2422 u. 2963. ***Stoklasa,** J., (1) Oesterr. Chem.-Ztg., 1903, Bd. 6, S. 289. — (2) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1904, Bd. 22, S. 460. — (3) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1905, Bd. 38, S. 664. — (4) Centralbl. f. Physiologie, 1905, Bd. 18, S. 793. ***Stoklasa,** J., **Černý,** F., **Jelínek,** J., und **Vítek,** E., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 13, S. 86. — (2) Zeitschrift f. d. landw. Versuchswesen in Oesterr., 1904, Bd. 7, S. 755. ***Stoklasa,** J., **Jelínek** und **Vítek,** (1) Beiträge z. chem. Physiologie u. Pathologie, 1903, Bd. 3, S. 460. ***Stoklasa,** J., und **Simáček,** E., (1) Centralbl. f. Physiologie, 1903, Bd. 17, S. 209. ***Takahashi,** T., (1) Bullet. College Agric. Tokio, 1902, Bd. 4, S. 395. ***Telesnin,** L., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 12, S. 205. ***Traube,** M., (1) Poggendorffs Ann., 1858, Bd. 171, S. 331. — (2) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1874, Bd. 7, S. 872 u. 1756. ***Vandevelde,** A. J. J., (1) Bull. Assoc. Belge des Chimistes, 1903, Bd. 17, S. 398. ***Wehmer,** C., (1) Bot. Ztg., 2. Abt., 1898, Bd. 56, S. 53. ***Weinland,** E., (1) Z. f. Biologie, 1901, Bd. 42, S. 55; 1902, Bd. 43, S. 86. ***Will,** H., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1897, Bd. 20, S. 363. — (2) Ebenda, 1898, Bd. 21, S. 291. — (3) Ebenda, 1896, Bd. 19, S. 20. ***Wortmann,** J., (1) Vortrag.: Chem.-Ztg., 1898, Bd. 22, S. 790. ***Wróblewski,** A., (1) Centralbl. f. Physiologie, 1898, Bd. 12, S. 697. — (2) Ebenda, 1899, Bd. 13, S. 284. — (3) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1898, Bd. 31, S. 3218. — (4) J. f. prakt. Chem., 1901, 2. Folge, Bd. 64, S. 1.

(Manuskript-Einlauf: 30. Juli 1906.)

18. Kapitel.

Chemismus der Alkoholgärung.

Von

Dr. ARMINIUS BAU,
Chemiker der Kaiserbrauerei zu Bremen.

§ 85. Der Chemismus und die Hauptprodukte der Alkoholgärung.

Wie schon in der Einleitung zum Ersten Bande dieses Werkes erwähnt wurde, mußte man bereits im Altertum die Beobachtung gemacht haben, daß bei der Erzeugung von Wein, Met und anderen alkoholhaltigen Getränken aus dem ursprünglich vorhandenen Most, dem Honig- 5 Wassergemisch und anderen ähnlichen Rohstoffen die Süßigkeit des Geschmackes verschwindet, sich Schaum bildet und ein Gas entweicht, und daß der Genuß des fertig vergorenen Getränkes ganz anders auf den menschlichen Körper einwirkt als das Trinken der frischen Weinsäfte oder der aus anderen Stoffen hergestellten süßen Lösungen. Trotzdem 10 blieben die Veränderungen, die während der Gärung eintreten, lange Zeit unaufgeklärt, und es war nicht die auffällige Erscheinung der Schaumbildung und die Entbindung eines stechend riechenden Gases, welche zuerst einer eingehenden Beachtung teilhaftig wurde, sondern die Entstehung des Alkohols. Als die alexandrinische Schule die ur- 15 sprünglich nur höchst einfachen Destillationsgefäße verbessert hatte, unterwarf man auch den Wein der Destillation und erzielte hierdurch ein Produkt, welches die berauschende Eigenschaft des Weines in verstärktem Maße besaß. Die Entdeckung und die Gewinnung des Alkohols schloß sich an die Erfindung und weitere Ausbildung der Destillations- 20 methoden an. Eine Beschreibung der letzteren findet sich in dem von SYNESIOS, der Anfangs des fünften Jahrhunderts in Alexandria studierte, herausgegebenen Kommentar zu den Werken von DEMOKRIT, angeblich dem ältesten uns bekannten Alchemisten. Unsere Kenntnisse, daß man Wein destilliert habe, reichen bis in das achte Jahrhundert zurück, 25 denn aus den Schriften des Alchimisten GEBER erhellt, daß diesem der Weingeist bereits bekannt war. Versuche, das wässerige Destillat aus Wein durch erneute Destillation zu verstärken, zu rektifizieren, wurden wohl schon frühzeitig unternommen. So hatte der Spanier RAYMUNDUS LULLUS (1235—1315) gefunden, daß man das Destillat durch Behandeln 30 mit geglühter Pottasche und nachfolgende Destillation verstärken könne. Um das Jahr 1413 beschrieb BASILIUS VALENTINUS Verfahren zur Gewinnung eines konzentrierteren Produktes verständlicher. Doch erst dem russischen Chemiker TOBIAS LOWITZ gelang es im Jahre 1796, durch Kombination von wasserentziehenden Mitteln mit fraktionierter 35 Destillation wasserfreien Alkohol darzustellen.

Nach seiner ursprünglichen Herstellung wurde der Alkohol (diese Bezeichnung ist arabischen Ursprunges) spiritus vini, Weingeist, auch spiritus vitis, Rebengeist, genannt. Die wissenschaftliche Bezeichnung

dieses Gärproduktes ist Aethylalkohol oder, nach der neueren Terminologie, Methylcarbinol. Ihm kommt die chemische Formel $CH_3—CH_2 \cdot OH$ zu; es ist die Methylgruppe CH_3 mit dem Carbinol $CH_2(OH)$, oder, wenn wir es anders auffassen, die Aethylgruppe C_2H_5 mit dem Hydroxyl (OH) gesättigt. Der Aethylalkohol wird gemeinhin kurzweg Alkohol genannt. Begegnen wir in der Literatur dem letzteren Ausdruck, so ist stets der Aethylalkohol gemeint; in allen anderen Fällen wird die besondere Art des Alkohols durch Zusätze, wie Methyl-, Propyl-, Butyl- usw., bezeichnet.

Wie der Alkohol entsteht, wußte man früher nicht, bis J. J. Becher im Jahre 1669 die Ansicht aussprach, nur zuckerhaltige Flüssigkeiten unterlägen der Gärung (s. Bd. I, S. 3). Die Natur des sich bei der letzteren entwickelnden Gases blieb lange Zeit unbekannt. Zwar hatte der Chemiker und Arzt B. van Helmont (1577—1644) auf die Tatsache erneut hingewiesen, daß sich bei der geistigen Gärung ein „Gas“ entwickelt, indessen geht aus seinem nachgelassenen Werke „Ortus medicinae vel opera et opuscula omnia“, das erst 1648 gedruckt wurde, nicht klar hervor, ob er die Natur des sich bei der Alkoholgärung bildenden Gases sicher erkannt habe. Mac Bride blieb es vorbehalten, im Jahre 1764 die Uebereinstimmung des Gärungsgases mit dem gas carbonum oder gas sylvestre, wie es van Helmont nannte, klarzulegen und die Identität desselben mit der Kohlensäure (CO_2) zu beweisen.

In welchen Mengen entstehen nun die Hauptprodukte der Alkoholgärung?

Nach einem Versuche von Cavendish, der 27 Proz. Kohlensäure des zersetzten Zuckers fand, trat zuerst Lavoisier (1) der quantitativen Bestimmung dieser beiden Gärungserzeugnisse näher. Bei der Vergärung eines Zentners Zucker erhielt er 35 Pfund, 5 Unzen, 4 Drachmen, 19 Gran Kohlensäure und 57 Pfund, 11 Unzen, 14 Drachmen, 14 Gran wasserfreien Alkohol, während 4 Pfund, 1 Unze, 4 Drachmen, 3 Gran Zucker unzersetzt blieben. In Prozenten ausgedrückt gaben diese Zahlen 36,8 Proz. Kohlensäure und 60,1 Proz. Alkohol. Die Abweichung dieser Werte von den in späterer Zeit gefundenen darf nicht wundernehmen; denn einerseits waren damals die analytischen Methoden nicht so gut ausgebildet wie heute, andererseits bedingte die kolossale Menge von einem Zentner Zucker — auch Dubrunfaut (1) verwandte über ein halbes Jahrhundert später noch 2559 kg Zucker zu einem Gärversuch — in der Wiedergewinnung der Spaltungsprodukte überhaupt Fehler. Es bedurfte unter den gegebenen und gewählten Umständen des genialen Geistes eines Lavoisier, Gay-Lussac und Dubrunfaut, um überhaupt Zahlen zu erhalten, welche der Wirklichkeit verhältnismäßig nahekamen.

Gay-Lussac (1) gab auf Grund seiner Versuche die Gärungsgleichung

$$\underset{\text{Rohrzucker}}{C_{12}H_{24}O_{12}} = \underset{\text{Alkohol}}{4\,C_2H_6O} + \underset{\text{Kohlensäure}}{4\,CO_2}$$

in welcher die chemischen Formeln nach den heute geltenden Atomgewichten umgeschrieben sind. Er beging aber dabei den Fehler, dem Rohrzucker eine unrichtige Zusammensetzung unterzulegen. Dieser Irrtum wurde von Dumas und Boullay (1) aufgeklärt, welche zeigten, daß Gay-Lussac's Gleichung nur für die Glucose $C_6H_{12}O_6 = 2C_2H_6O + 2CO_2$ wahr sei. Wie auf S. 396 noch näher dargelegt werden wird, kann Rohrzucker nur nach Aufnahme eines Moleküles Wasser gären. Die angegebene Gleichung würde als Spaltungsprodukte 48,89 Proz. Kohlensäure

und 51,11 Proz. Alkohol bedingen. Dubrunfaut (1) erhielt bei seinem Versuche 45,17 Proz. Kohlensäure und 46,15 Proz. Alkohol und wies darauf hin, daß man die theoretischen Ausbeuten an beiden Erzeugnissen nicht erzielen könne.

Den Grund zu einer exakteren Forschung legte Pasteur (1), indem er zeigte, daß konstant bei der Alkoholgärung Nebenprodukte auftreten, während ein Teil des Zuckers zum Aufbau von Zellsubstanz verbraucht wird. Elion (1) wies darauf hin, daß die Hefe während der Gärung Zucker assimiliert, der mithin nicht in Gärprodukte verwandelt wird. Auch nach Wortmann (1) gehen vom vorhandenen Zucker rund 5 Proz. auf die Hefe über, deren Verarbeitung zum Aufbau der Hefensubstanz und nicht mit zur Gärung gehört; letztere Bezeichnung kommt im wissenschaftlichen Sinne nur dem Spaltungsprozeß zu, dem etwa 95 Proz. des Zuckers anheimfallen. Demzufolge kann niemals die gesamte Menge des Zuckers in Alkohol und Kohlensäure zerlegt werden.

Es würde zu weit führen und für den Leser zu ermüdend wirken, wollten wir alle Untersuchungen, die sich mit der quantitativen Bestimmung der Hauptgärprodukte befassen, einzeln aufzählen. Es seien daher nur diejenigen Versuche erwähnt, welche die höchsten Werte lieferten. So erhielten an Kohlensäure: Pasteur (1) 46,4 Proz., Jodlbauer (1) 46,54 Proz., Kosutány (1) 47,5 Proz., während an Alkohol gewonnen wurden: 48,3 Proz. von Pasteur, 48,67 Proz. von Jodlbauer und 47,5—48,08 Proz. von Kosutány. Von der theoretischen Ausbeute wurden somit im besten Falle 95,2 Proz. Kohlensäure und 95,2 Proz. Alkohol erhalten, so daß für die Hauptmenge des während der Alkoholgärung zersetzten Zuckers die Gleichung

$$C_6H_{12}O_6 = 2CO_2 + 2C_2H_6O,$$

der auch Pasteur (1) nicht direkt widerspricht, bestehen bleibt.

Auch der zellenfreien Gärung (s. S. 353) wollen wir gedenken. Buchner und Rapp (1) erhielten aus 26 g Rohrzucker 12,2 g Kohlensäure und 12,4 g Alkohol, welche Zahlen einem Prozentgehalt von 46,9 und 47,6 entsprechen. Bei einem zweiten Versuch erhielten diese Forscher (2) aber 50,4 Proz. Alkohol. Wir dürfen indessen diese Zahlen nicht mit den oben erwähnten Werten in Vergleich stellen, denn letztere sind aus Traubenzucker (Glucose, s. S. 398) gewonnen. Dieser liefert theoretisch 48,89 Proz. Kohlensäure und 51,11 Proz. Alkohol, während aus Rohrzucker im Höchstfalle 51,45 bezw. 53,62 Proz. entstehen können.

Um die erwähnten Zahlen für die Hauptprodukte der Alkoholgärung zu erlangen, bedarf es natürlich der günstigsten Bedingungen für die Gärung. Es ist aber dabei gleich, ob der Zucker vollständig vergoren wurde, oder ob ein Rückstand desselben blieb, wenn man nur die Menge des wirklich vergorenen Zuckers feststellt und zu dem gewonnenen Alkohol und der Kohlensäure in Beziehung setzt. Jodlbauer (1) macht darauf aufmerksam, daß sich die Hefe mit dem zunehmenden Alter in der Weise verändert, daß sie bei vollständiger Vergärung des Zuckers immer geringer werdende Mengen Kohlensäure aus dem vergorenen Zucker erzeugt. Dies ist sowohl bei gewöhnlicher Hefe als auch bei der Reinhefe der Fall. So erhielt Jodlbauer bei frischer Hefe 49,02, 48,97, 49,17 Proz., bei der gleichen, alt gewordenen Hefe nur 47,67, 47,44 und 46,98 Proz. Kohlensäure aus dem Rohrzucker. Unterbricht man dagegen die Gärung nicht nach dem vollständigen Verschwinden des Zuckers, sondern führt die Kohlensäurebestimmung weiter,

so erhält man häufig *mehr* Kohlensäure, welche sich dann durch Selbstgärung (s. § 98) der Hefe bildet.

Annähernd ist also das Verhältnis des erzeugten Alkohols zur Kohlensäure wie 1 : 1; bei der Zymasegärung schwankt es nach BUCHNER und HAHN (1) von 1 : 0,90 bis 1 : 1,01. Bestimmt man jedoch während der einzelnen Phasen der Gärung diese beiden Hauptprodukte, so findet man, nach LINDET und MARSAIS (1), daß im Anfange der Gärung sich *weniger* Kohlensäure im Verhältnis zu Alkohol entwickelt als gegen Ende. Die genannten Forscher erhielten ein Verhältnis von Alkohol zu Kohlensäure im Beginn der Gärung wie

1 : 0,93, 1 : 0,79, 1 : 0,89, 1 : 0,91 und 1 : 0,79,

am Ende derselben wie

1 : 1,01, 1 : 1,00, 1 : 1,09, 1 : 1,03 und 1 : 1,02.

Die Gärtemperatur, sowie die An- oder Abwesenheit von Säure in der Würze waren auf die Erscheinung ohne Einfluß. LINDET und MARSAIS fanden im Anfangsstadium auf 1 g Alkohol 0,048 g erzeugter Hefe, am Schluß der Gärung dagegen nur 0,002 g.

Der *Chemismus* der Gärung läßt sich am einfachsten durch die bereits erwähnte Formel

$$C_6H_{12}O_6 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_6O$$

wiedergeben. Daß der Zerfall des Zuckers in dieser einfachen Weise nicht vor sich gehen kann, dürfte selbstverständlich sein. Schon im Jahre 1858 sprach TRAUBE (1) die Ansicht aus, daß die Veränderungen, welche die organischen Körper durch Fermente erleiden, so auch die Gärung, fast immer unter aktiver Beteiligung des Wassers vor sich gehen. Ebenso äußert sich HOPPE-SEYLER (1): „Alle fermentativen Prozesse verlaufen nur in hinreichend verdünnten Lösungen ungestört, und die chemische Mitwirkung des Wassers scheint für alle erforderlich zu sein.“ Für die Alkoholgärung würden wir also die Gleichung

$$C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O = 2\,H_2CO_3 + 2\,C_2H_6O.$$

erhalten. Es bildet sich also neben Alkohol *Kohlensäurehydrat*.

Es möge hier eine kleine Abschweifung erlaubt sein. Was wir gewöhnlich Kohlensäure nennen, ist richtig Kohlensäureanhydrid CO_2; der eigentlichen Kohlensäure kommt die chemische Formel H_2CO_3 zu, doch wollen wir *diese*, um Irrtümer zu vermeiden, Kohlensäurehydrat nennen. Letzteres zerfällt sehr leicht in Kohlensäure und Wasser nach der Gleichung $H_2CO_3 = H_2O + CO_2$, so daß dasselbe nur ein während kurzer Zeit bestehendes Zwischenprodukt wäre. Nach A. BAEYER (1) geht die Alkoholgärung in zwei Phasen vor sich. In der ersten tritt eine Verschiebung von Hydroxylgruppen des Zuckers unter Reduktion der einen Reihe von Kohlenwasserstoffgruppen und Anhäufung von Sauerstoff an den anderen ein, dann soll eine Spaltung der Kohlenstoffkette da eintreten, wo der Sauerstoff angehäuft ist. Hierbei soll entweder das äußere Anhydrid der Aethylkohlensäure oder dasjenige der Milchsäure entstehen können, entsprechend einerseits der Alkoholgärung, andererseits der Milchsäuregärung. Auch andere Forscher, so WAGNER (1) und KRUIS und RAÝMAN (1), halten eine wechselweise Hydratation und Dehydratation der Kohlenstoffatome für wahrscheinlich, ohne aber näher auf die Erklärung des Gärungsvorganges einzugehen.

Formel I.

$$\begin{array}{l} a \\ CHO \\ | \\ CHOH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} + \begin{array}{l} H \\ H \end{array} O = \begin{array}{l} b \\ CHO \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} + \begin{array}{l} CH(OH)_2 \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \\ c \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} CHO \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \\ d \end{array} + H_2O.$$

Formel II.

$$\begin{array}{l} CHO \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} + \begin{array}{l} H \\ H \end{array} O = \begin{array}{l} CHO \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_3 \end{array} + H_2O_2.$$

Formel III.

$$\begin{array}{l} CHO \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_3 \end{array} + O = \begin{array}{l} COOH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_3 \end{array}$$

NENCKI (1) ist ebenfalls der Ansicht, daß die Alkoholgärung nur unter Aufnahme von Wasser in das Zuckermolekül vor sich gehen könne, und bespricht ausführlich die Umwandlung des Zuckers in Milchsäure. Wir müssen seinem Gedankengange folgen, da auch BUCHNER eine ähnliche Hypothese für die Alkoholgärung aufstellt. Das Zuckermolekül *a* (s. Formel I) addiert ein Molekül Wasser und zerfällt in Dioxypropionaldehyd *b* und ein Zwischenprodukt *c*, welches Wasser abspaltet und ebenfalls in Dioxypropionaldehyd *d* übergeht. Letzteres tritt mit Wasser in Reaktion (s. Formel II) und bildet Milchsäurealdehyd, sowie Wasserstoffsuperoxyd. Dieses zerfällt leicht in Wasser und nascierenden Sauerstoff, welcher das Milchsäureanhydrid zu Milchsäure oxydiert (s. Formel III). Die Milchsäure enthält aber die Elemente der Hauptgärprodukte, Alkohol und Kohlensäure:

$$\begin{array}{l} COOH \\ CHOH \\ | \\ CH_3 \end{array} = \begin{array}{l} CO_2 \\ \\ \\ \end{array} + \begin{array}{l} \\ CH_2OH \\ | \\ CH_3 \end{array}.$$

BUCHNER und MEISENHEIMER (1) hatten bei ihrer zellenfreien Gärung (s. S. 353) Essigsäure und Milchsäure aufgefunden. Bezüglich der letzteren wurde zunächst der Gehalt an dieser Säure im frischen Preßsaft bestimmt und diese Untersuchung nach viertägigem Stehen der Preßsäfte mit und ohne Zuckerzusatz wiederholt. Der Milchsäuregehalt des frischen Saftes war alsdann bei zwei Versuchen ohne Zuckerzusatz verschwunden, bei Zuckerzusatz aber gleich geblieben, beziehungsweise auf das Doppelte gestiegen. Bakterien waren selbstverständlich in dem Preßsaft nicht zugegen. Wurden zu 500 ccm Preßsaft 1,5 g Milchsäure zugesetzt, so verschwanden diese nach eintägigem Stehen vollständig; bei weiteren Versuchen nahm die zugesetzte Milchsäuremenge nicht ab. Später ergab sich aber in den Preßsäften, gleichgültig, ob Milchsäure zugesetzt war, oder nicht, in drei Versuchsreihen eine Neubildung von Milchsäure, die mit steigendem künstlichen Milchsäurezusatz geringer wurde, wohl infolge des schädigenden Einflusses dieser Säure. Das verschiedene Verhalten der Preßsäfte ist wahrscheinlich auf die Beschaffenheit der Hefe zurückzuführen: denn beim Lagern der Hefe wächst die Neigung der aus solcher alten Hefe hergestellten Preßsäfte zur Milch-

säurebildung. In den Fällen, in welchen Milchsäurebildung ohne Zuckerzusatz beobachtet werden konnte, erfolgt diese jedenfalls auf Kosten des Glycogengehaltes der Hefe (vergl. S. 96). Das Hauptergebnis dieser Versuche ist nun, daß die Milchsäure bei der Spaltung des Zuckers eine große Rolle spielt und wahrscheinlich als Zwischenprodukt der Alkoholgärung auftritt. Will man sich diesen Vorgang bildlich klarmachen, so betrachte man zunächst die Formel IV. Das Zuckermolekül, Glucose, *a*, nimmt vier Moleküle Wasser, die hier als Hydroxylgruppen und Wasserstoffatome geschrieben sind, auf und spaltet sofort fünf Moleküle Wasser ab, so daß als vorübergehendes Zwischenprodukt *b* eine Dioxy-γ-Ketonsäure entstehen würde. Letztere addiert ein Molekül Wasser (s. Formel V) und zerfällt in zwei Moleküle Milchsäure. Daß man letztere theoretisch als Quelle der Kohlensäure und des Alkohols betrachten kann, ist bereits auf S. 375 erwähnt worden.

Formel IV.

$$
\begin{array}{llll}
CHO & O\;H & COOH & H_2O \\
CHOH & OH & CHOH & \\
CH\;OH & H\;H & CH_2 & H_2O \\
C\;HOH & +\;O\;H & CO & H_2O \\
CHOH & OH & CHOH & H_2O \\
CH_2\;OH & H\;H & CH_3 & H_2O \\
a & & b &
\end{array}
\qquad \begin{array}{c}\rightarrow \quad \text{(Spalte 3)} \quad + \quad \text{(Spalte 4)}\end{array}
$$

Formel V.

$$
\begin{array}{l}
COOH \\
CHOH \\
CH_2 \\
CO \\
CHOH \\
CH_3 \\
b
\end{array}
\quad + H_2O \rightarrow \quad
\begin{array}{l}
COOH \\
CHOH \\
CH_3 \\
COOH \\
CHOH \\
CH_3
\end{array}
$$

GRÜSS (1) kommt bei seinen Studien zu dem Resultat, daß sein Reduktionskörper der Hefe (s. Bd. I, S. 258) als Hydrogenase zu betrachten sei. Diese würde das Zuckermolekül zunächst in Kohlensäure und Wasserstoff zerlegen, und letzterer würde aus einem zweiten und dritten Zuckermolekül Alkohol und Wasser abspalten. Die folgenden Formelgleichungen mögen diesen Vorgang veranschaulichen:

$$
1. \left\{ \begin{array}{lll}
CH_2OH + H_2O & \rightarrow & CO_2 + 5H \\
4\,[CHOH + H_2O] & \rightarrow & 4\,(CO_2 + 4H) = 4CO_2 + 16H \\
COH \quad + H_2O & \rightarrow & CO_2 + 3\,H
\end{array} \right.
$$

$$
2. \left\{ \begin{array}{lll}
2\,CH_2OH + 2\,H & \rightarrow & C_2H_5OH + H_2O \\
2\,(4CHOH) + 16H & \rightarrow & 4\,C_2H_5OH + 4H_2O \\
2COH \quad + 6H & \rightarrow & C_2H_5OH + H_2O
\end{array} \right.
$$

Noch einfacher könnte man nach GRÜSS die Alkoholgärung durch den direkten Zerfall des Zuckermoleküls erklären, was sich durch folgendes Formelbild zeigen läßt:

$$\begin{array}{ll} CH_2 & HO \\ CH & HO \\ CH & HO \quad \rightarrow 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2 \\ CH & HO \\ CH & HO \\ CO & H \end{array}$$

Die letztere Anschauung erscheint überhaupt nicht diskutabel, denn sie läuft auf die alte Gleichung $C_6H_{12}O_6 = 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2$ hinaus, welche nicht den geringsten Einblick in den Mechanismus der Alkoholgärung gestattet. Die andere Erklärungsweise von GRÜSS setzt bei diesem Vorgange die Mitwirkung von drei Molekülen Zucker voraus, sie wird hierdurch komplizierter als die weiter oben erwähnten Hypothesen. Zur Stütze dieser letzteren wäre es natürlich erwünscht, wenn es gelänge, das Zwischenprodukt zwischen Zucker und Milchsäure zu fassen, also entweder den Dioxypropionaldehyd NENCKI's, oder die Dioxy-γ-Ketonsäure BUCHNER's.

Die merkwürdigen Eigenschaften des Hefenpreßsaftes, der bald das Verschwinden, bald die Bildung von Milchsäure bewirkt, ließe sich durch die Annahme zweier Enzyme erklären, von denen das eine den Zucker in Milchsäure spaltet, während das andere die Zersetzung dieser Säure in Alkohol und Kohlensäure bewirkt. Sind beide Enzyme im Ueberschuß vorhanden, oder werden beide stetig neu gebildet, so lassen sich nur die Endprodukte der Spaltung gewinnen. Dies ist der Fall bei der Gärung mit lebender Hefe, bei der übrigens noch die Zwischenprodukte durch die Ernährungsvorgänge verschwinden können. Das erstere Enzym, welches also Zucker in Milchsäure spaltet, nennen BUCHNER und MEISENHEIMER (2) nunmehr Zymase oder genauer Hefenzymase, während sie das letztere, welches die Milchsäure in Alkohol und Kohlensäure zerlegt, mit dem Namen Lactacidase belegen. Die Ansicht, daß sich als Zwischenprodukt zwischen dem Zucker und der Milchsäure eine Dioxy-γ-Ketonsäure bilde, lassen die genannten Forscher nunmehr fallen, es könnte als solcher Zwischenkörper, wie schon A. WOHL und NEF äußerten, indessen Methylglyoxal entstehen. Hiermit steht im Einklang, daß sowohl bei der Vergärung von Rohrzucker wie von Traubenzucker stets nur inaktive Milchsäure gefunden wird, wie es begreiflich ist, wenn Methylglyoxal (CH_3 — CO — CHO) das regelmäßige Durchgangsprodukt bildet.

Es fragt sich nun, ob wir auf rein chemischem Wege, ohne Enzymwirkungen, ähnliche Umsetzungen erzielen können; ein positives Ergebnis ließe die Hypothese BUCHNER's leichter verständlich erscheinen. Die von DUCLAUX (2) beobachtete Entstehung von Alkohol und Kohlensäure in einer mit Kalilauge versetzten Glucoselösung (s. S. 349) ist durch BUCHNER und MEISENHEIMER (1) bestätigt worden; sie erhielten 2,6 Proz. Alkohol aus dem Zucker. Nimmt man aber an Stelle von Kalilauge Baryt- oder Kalkwasser, so entstehen aus dem Kohlenhydrat ohne Alkoholbildung 50 Proz. Milchsäure. Für die Spaltung der Milchsäure in Alkohol ist also das stärkere Alkali notwendig. Elektrolysiert man nach KOLBE (1) milchsaures Kalium, so bilden sich Kohlensäure und Aldehyd, und erwärmt man Milchsäure mit wässeriger Chromsäure, so entsteht zufolge DOSSIOS (1) ebenfalls Kohlensäure und daneben Essigsäure. Aldehyd und Essigsäure sind aber die einfachsten Derivate des Alkohols, so daß

auf chemischem Wege der Beweis erbracht ist, daß in dem Molekül der Milchsäure die Atomkomplexe Kohlensäure und Alkohol enthalten sind. Nach DUCLAUX zerfällt milchsaures Calcium in wässeriger Lösung im Sonnenlichte bei Luftzutritt direkt in Alkohol, kohlensauren und essigsauren Kalk, und nach HANRIOT bildet dasselbe Salz, mit Aetzkalk erhitzt, große Mengen von Aethylalkohol und Aceton. *Allescheria (Eurotiopsis) Gayoni* (s. S. 236 u. 254) erzeugt, wie MAZÉ fand, in milchsäurehaltiger Nährlösung ebenfalls Alkohol.

§ 86. Die nicht-flüchtigen Nebenprodukte der Alkoholgärung: Glycerin, Isobutylenglycol, Bernsteinsäure, Oxalsäure, Milchsäure.

Bei der Betrachtung der Hauptprodukte der Alkoholgärung im vorstehenden Paragraphen sahen wir, daß nicht die Gesamtmenge des Zuckers in Alkohol und Kohlensäure umgesetzt wird, sondern nur etwa 95 Proz.

LAVOISIER (1) hatte schon beobachtet, daß bei seinem Gärversuche eine organische Säure, die er als Essigsäure ansprach, auftrat, welche 2,63 Proz. des vergorenen Zuckers ausmachte. Jedoch war PASTEUR (1) der erste, welcher betonte, daß bei der Alkoholgärung ständig Nebenprodukte vorkommen, zu deren Erzeugung etwa 5—6,5 Proz. des Zuckers verbraucht werden. Als solche Nebenerzeugnisse gab er im Jahre 1857 die Bernsteinsäure, welche C. SCHMIDT (1) schon aufgefunden hatte, an und entdeckte im Jahre 1858 das Glycerin, ferner Fett, Cellulose und andere unbekannte Körper. Der Ansicht folgend, daß diese Substanzen aus dem Zucker entständen, gab er für die Zersetzung des letzteren in diesem Sinne folgende Gleichung:

$$\underset{\text{Glucose}}{49C_6H_{12}O_6} + 30H_2O = \underset{\text{Bernsteinsäure}}{12C_4H_6O_4} + \underset{\text{Glycerin}}{72C_3H_8O_3} + 30CO_2$$

Von 100 Gewichtsteilen vergorenen Zuckers erhielt PASTEUR 3,607—3,64 Teile Glycerin, 0,673—0,76 Teile Bernsteinsäure und 1,2—1,3 Teile andere Körper.

In bezug auf das **Glycerin** fand BOUSSINGAULT (1) bereits, daß dieses zum vergorenen Zucker in keiner bestimmten Beziehung stände, auch bilde Hefe, mit Wasser bei 40—41° digeriert, selbst Glycerin, und zwar erhielt er aus 30 g Hefe 0,19—0,335 g. Auf das Gewicht des vergorenen Zuckers bezogen, fand er 2,5—2,87 Proz. Glycerin. Letzteres vermehrt sich, wenn die Gärung durch Luftverdünnung, vergrößerte Hefengabe und Temperatursteigerung beschleunigt wird. MORITZ (1), sowie THYLMANN und HILGER (1) fanden die Glycerinbildung bei langsamer Gärung und niedriger Temperatur vermindert, ebenso durch Temperaturen, die höher lagen als 35°, bei welcher zugleich die Gärung verlangsamt wird, vermehrt dagegen bei Zusatz von Nährstoffen, bei beschleunigter Gärung und hoher Zuckerkonzentration. Das Verhältnis zwischen dem erzeugten Alkohol und Glycerin schwankte bei den Versuchen von MORITZ von 100 : 9,3 bis 100 : 13,8, bei denjenigen von THYLMANN und HILGER von 100 : 1,638 bis 100 : 11,78, also in sehr weiten Grenzen.

Nach MÜLLER-THURGAU wird, wie MORITZ (1) berichtet, die Menge des Glycerins durch die größere oder geringere Lebensenergie der Hefe bestimmt und steht zu dieser in einem direkten Verhältnis, so daß hierin die Schwankungen in den Beziehungen Alkohol zu Glycerin ihre

Erklärung finden. Auch nach Straub (1) besteht zwischen dem vergorenen Zucker und dem erzeugten Glycerin kein bestimmtes Verhältnis, im übrigen stimmen seine Ergebnisse, wie auch diejenigen von Kulisch (1) mit den Angaben Thylmann's und Hilger's überein. Die Glycerinmenge steigt nicht proportional dem Alkoholgehalt, sie erfährt eine Vermehrung durch reichliche Ernährung der Hefe, besonders durch solche mit stickstoffhaltigen Substanzen.

Nachdem Müller-Thurgau im Jahre 1884 ausgesprochen hatte, das Glycerin sei kein Gärprodukt sondern ein Stoffwechselerzeugnis der Hefe, kam Wortmann (1) bei der Untersuchung von 41 Mosten mit Reinhefen zu folgendem Resultat. In normalen Fällen ist das Verhältnis von Alkohol zu Glycerin wie 100 : 7 bis 100 : 14. Reinhefen erzeugen durchschnittlich weniger Glycerin. Für die Beurteilung der Weine ist das Verhältnis von Alkohol zu Glycerin gar nicht maßgebend. Die Größe der Glycerinbildung ist nicht auf die Anzahl der tätig gewesenen Hefenzellen zu setzen: die Menge desselben ist nicht allein von der Zusammensetzung des Mostes sondern in hohem Grade von der spezifischen glycerinbildenden Tätigkeit der Hefenrasse abhängig. Die Glycerinbildung ist ferner auch nicht vom Aschengehalt des Mostes abhängig, auch nicht von der Menge der Hefe; es existiert überhaupt kein gegenseitiges Verhältnis unter den einzelnen Gär- und Stoffwechselprodukten. Schärfer spricht sich Wortmann (2) noch später aus. Die Menge eines in einem Moste enthaltenen, beziehungsweise von der Hefe aufgenommenen Nährstoffes ist in keinem Fall für die Quantität eines der gebildeten Stoffwechselprodukte entscheidend. Die Bildung von Kohlensäure und Alkohol verläuft völlig unabhängig von der Bildung des Glycerins.

Auch Laborde (1) schreibt die verschiedenen erzeugten Mengen Glycerin den besonderen Hefenrassen zu; so erhielt er mit letzteren in demselben Weinmost für 100 g Zucker 2,5—7,75 g Glycerin, im Mittel etwa 3 g. Die Produktion von Glycerin steht im umgekehrten Verhältnis zur Aktivität der Hefe und steigt besonders dann an, wenn man zum Most solche der Hefe ungewohnte stickstoffhaltige Nährstoffe zufügt, wie Liebigs Fleischextrakt, Hefenwasser usw.; ferner vermehrt sich Glycerin bei hoher Gärtemperatur, hoher Zuckerkonzentration, sowie bei starkem Ansäuern mit Weinsäure. Vermindert dagegen erscheint die Glycerinbildung in künstlichen Nährlösungen; ebenso ist sie geringer in einer Zuckerlösung, der man vor der Gärung Alkohol zugefügt hatte. Dieselbe Hefe erzeugt in Lösungen verschiedener Zuckerarten zum Teil verschiedene Mengen von Glycerin, so aus Galactose und invertiertem Milchzucker 3,15 g, aus Glucose, Fructose, Rohrzucker und Maltose unter genau den gleichen Bedingungen stets 2,45 g. Eine Milchzuckerhefe produzierte in einer Lösung von Milchzucker 1,75 g, von invertiertem Milchzucker aber 3,16 g Glycerin aus 100 g Zucker.

Im Anfang der Gärung ist die Glycerinbildung geringer als gegen Ende; so erhielt Effront (1) nach

24	48	72	und	94	Stunden
0,15	0,35	0,40	und	0,91	Proz. Glycerin

An Konservierungsmittel gewöhnte Hefe (s. Bd. V, S. 301—303) erzeugt nach Effront (2) wohl Glycerin; die Bildung des letzteren läßt aber in fortlaufendem Maße nach, je mehr sich die Hefe an das Antiseptikum gewöhnt, so daß man schließlich eine Gärung erzielen könne, welche genau nach der theoretischen Gleichung verlaufe, ohne Erzeugung von Nebenprodukten.

Sehr zahlreich sind die Untersuchungen, welche sich mit der Feststellung des Verhältnisses von Alkohol zu Glycerin im Wein befassen. Außer den bereits erwähnten Zahlen seien nur noch wenige angeführt. Das genannte Verhältnis stellt sich nach BORNTRÄGER (1) wie 100 : 6,0, nach BERNHEIMER (1) wie 100 : 8,3 bis 100 : 11,8, nach K. WINDISCH (1) wie 100 : 5,6 bis 100 : 12,8, nach PETKOW (1) im Weißwein wie 100 : 7,0 bis 100 : 12,32, im Rotwein wie 100 : 7,0 bis 100 : 11,83, und nach K. WINDISCH (2) wie 100 : 6,1 bis 100 : 10,2. Die wissenschaftlich erforschten Ziffern des Verhältnisses von Alkohol zu Glycerin schwanken bei einwandfreien Weinen derartig, daß eine Festlegung von Grenzzahlen durch staatliche Gesetze untunlich erscheint. Eine reelle Produktion wäre unter Umständen durch eine derartige Normierung chikanösen Maßnahmen ausgesetzt.

Während sich die meisten bisher erwähnten Studien über die Glycerinbildung auf die Vergärung von Weinmosten und Zuckerlösungen beziehen, wollen wir nun noch einige Untersuchungen anführen, die das Bier betreffen. Aus der gleichen Würze stellte BORGMANN (1) mittelst zweier verschiedenen Reinkulturen Biere her, die 0,109 und 0,137 Proz. Glycerin enthielten oder ein Verhältnis von Alkohol zu Glycerin von 100 : 2,63 und 100 : 3,24 zeigten. In Bieren, die ohne Reinkultur erzeugt waren, verhielt sich Alkohol zu Glycerin wie 100 : 4,14 bis 100 : 5,497. Auch AMTHOR (1) ließ Bierwürzen durch Reinkulturen von acht verschiedenen Hefenrassen vergären und fand den Glyceringehalt bei Verwendung von Reinhefen auffallend niedrig. Während in elsässischen Bieren im Mittel 0,144 Proz., in bayrischen 0,1266 Proz. Glycerin vorhanden waren, erzeugten die Reinhefen nur 0,1113 Proz. Das Verhältnis von Alkohol zu Glycerin stellte sich im Minimum wie 100 : 1,65, im Maximum wie 100 : 4,3, im Mittel wie 100 : 2,38.

Als Quelle des Glycerins bei der Gärung nahmen nach dem Vorgange PASTEUR's (1) die Mehrzahl der Forscher den Zucker an. UDRÁNSKY (1) hatte zuckerfreie Hefe, die ursprünglich 0,053 Proz. Glycerin enthielt, mit verdünntem Alkohol digeriert; ohne daß Selbstgärung der Hefe eingetreten war, hatte sich das Glycerin um 116—285, ja nach 13 Monaten auf 355,2 Proz. der ursprünglich vorhandenen Menge vermehrt, und zwar bei Ausschluß von Zucker. Die Quelle für das Glycerin ist wahrscheinlich das Lecithin. Letzteres, das HOPPE-SEYLER (2) auch in der Hefe fand (s. Bd. I, S. 284), zerfällt unter bestimmten Bedingungen in fette Säuren, Cholin und Glycerinphosphorsäure, und diese wird leicht in Phosphorsäure und Glycerin gespalten. DUCLAUX (1) will noch die Existenz besonderer Enzyme annehmen, welche Glycerin und Bernsteinsäure liefern; reine Zymase (Alkoholase) werde wahrscheinlich den Zucker glatt in Kohlensäure und Alkohol spalten. BUCHNER und RAPP (3) meinen indessen, dieser Zerfall des Zuckers sei, chemisch betrachtet, ein bei weitem komplizierterer Vorgang als z. B. die Invertierung des Rohrzuckers, es erscheine das regelmäßige Auftreten von Nebenprodukten nicht besonders auffällig, denn solche entstehen bei allen verwickelteren Prozessen. Eine Entscheidung über diese Frage könnte durch einen Versuch mittelst der zellenfreien Gärung erbracht werden. BUCHNER und RAPP (2) fanden bei der Vergärung von 100 g Rohrzucker mit Zymase 0,5 g Glycerin und 0,3 g Bernsteinsäure; die Nebenprodukte sind also in minderem Maße vorhanden, als sie PASTEUR (1) u. a. bei der Gärung mittelst Hefe erhielten. Als LAXA (1) in der Hefe das fettspaltende Enzym Lipase (s. Bd. I, S. 257)

nachgewiesen hatte, sprach DELBRÜCK (1 u. 2) die Ansicht aus, das Glycerin werde durch die Lipase aus Fett (Fettsäure-Glycerinester) abgespalten. Bereits früher hatte ROMMIER (1) ähnliches vermutet. In Brennereimaischen ist durch das eingemaischte Getreide ja stets Fett enthalten, bei der Bereitung von Würzen bleibt allerdings das meiste Fett zurück; es darf aber angenommen werden, daß sich etwas Fett und besonders Lecithin, wenn nicht im gelösten, so doch im emulgierten Zustande in der Würze befindet. Der Glyceringehalt der Biere und der Weine ist aber so hoch, daß er schwerlich aus dem in der Würze befindlichen Fett stammen kann. Indessen enthält Hefe nach NÄGELI und LOEW (1) stets Fett (s. Bd. I, S. 284), wie man Fetttröpfchen (vergl. S. 67 u. f.) häufig bereits mikroskopisch in den Zellen nachweisen kann. Fett wird also von den Hefenzellen zeitweise aufgespeichert und zu anderen Zeiten durch die Lipase wieder gespalten; die Spaltungsprodukte (Glycerin) gelangen ins Bier und in die gegorene Flüssigkeit überhaupt. Daß der BUCHNER'sche Preßsaft Lipase und Fett (aus der Hefe) enthält, ist mit Wahrscheinlichkeit anzunehmen. Diese Unterstellung hat insofern viel für sich, als sich trotz aller ausführlichen Untersuchungen keine gesetzmäßigen Beziehungen zwischen dem vergorenen Zucker und dem entstandenen Glycerin ergeben haben.

Isobutylenglycol fand HENNINGER (1) in einem roten Bordeauxwein und schätzte dessen Menge auf 0,05 Proz. oder ein Fünfzigstel vom vorhandenen Glycerin. Es ist aber zweifelhaft, ob dieser Körper ein Gärprodukt ist, wahrscheinlicher war er in dem Moste bereits enthalten, oder er bildete sich bei dem Versuche der Gewinnung; gibt doch Amylalkohol nach BUTLEROW (1) beim Zersetzen durch Hitze Isobutylen. SANSON (1) konnte Isobutylenglycol öfter nachweisen, auch im Kirschbranntwein kommt es nach K. WINDISCH (5) vor.

Die Untersuchungen über das Glycerin wurden häufig mit Bestimmungen der **Bernsteinsäure** verbunden. Als Entdecker der Entstehung der letzteren bei der Alkoholgärung wird gewöhnlich BEISSENHIRTZ (1) angeführt, doch fand derselbe nur in einer essigsauren Gärung eines Gemenges aus Brot, Johannisbrot, Honig, Essig, Branntwein und Wasser die Bernsteinsäure auf. SCHUNCK (1) hatte im Jahre 1853 bei der Alkoholgärung, die er durch ein Enzym des Krapps, das Erythrozym, zu erzeugen glaubte (s. S. 349), neben Kohlensäure etwas Wasserstoff und beträchtlichen Mengen von Alkohol auch kleine Mengen von Bernsteinsäure isoliert. Indessen gebührt C. SCHMIDT (1) sowie PASTEUR (1) das Verdienst, den Nachweis erbracht zu haben, daß Bernsteinsäure bei der Alkoholgärung als ständiges Nebenprodukt auftritt. Wie bereits erwähnt wurde, erhielt PASTEUR 0,673—0,76 Proz. dieser Säure aus dem Zucker und stellte die auf S. 378 mitgeteilte Zersetzungsgleichung des Zuckers auf.

Die Hypothesen über die Entstehung der Bernsteinsäure bei der Gärung sind im großen und ganzen die gleichen wie die über die Bildung des Glycerins. Nach BOUSSINGAULT (1) vermehrt sich die Bernsteinsäure bei Temperatursteigerung, großer Hefenmenge und im luftverdünnten Raume; nach MORIN und CLOUDON (1) erscheint sie bei Luftabschluß vermindert, während ihre Menge in offen vergorenen Lösungen wächst. In den einzelnen Stadien der Gärung ist die Menge der erzeugten Bernsteinsäure Schwankungen unterworfen. KAYSER und DIENERT (1) fanden, daß die Menge derselben zuerst ansteigt, um gegen Schluß der Gärung wieder abzunehmen. Dagegen konstatierte EFFRONT (2)

eine ständige Zunahme dieser Säure, welche ihr Maximum in den letzten Phasen der Gärung erreicht. So bestimmte er die Menge der Bernsteinsäure

nach	24	48	72	und	96	Gärstunden
zu	0,025	0,047	0,068	und	0,092	Proz.

THYLMANN und HILGER (1), sowie andere, führen für die Vermehrung oder Verminderung der Bernsteinsäure die gleichen Ursachen wie die bei der Bildung des Glycerins an.

Eingehende Studien über die Bernsteinsäure unternahm ALFR. RAU (1), indem er meist 15-proz. Lösungen von Rohrzucker, Traubenzucker und Malzzucker mit oder ohne Nährstoffe bei 15, 25 und 35° C durch drei verschiedene Hefen, teils mit, teils ohne Luftzutritt vergor und auch das Prinzip der unterbrochenen Gärung anwandte. Es ergaben sich so folgende Feststellungen: Die Gesamtsäure ist bei den höheren Temperaturen wesentlich vermehrt, durch Zufügung von Nährstoffen tritt keine Aenderung in dieser Beziehung ein. Der Gehalt an Bernsteinsäure zeigt keine großen Abweichungen; weder die Anwendung verschiedener Zuckerarten, noch die Vergärung bei Luftzutritt oder bei Abschluß von Luft, sowie endlich die Gegenwart oder Abwesenheit von Hefennährstoffen scheint die Bildung der Bernsteinsäure wesentlich zu beeinflussen. Bei Anwendung von Reinhefe und Preßhefe, welche eine energische Gärtätigkeit entfalteten, war die Menge der Bernsteinsäure gegenüber der Gärung mit Bierhefe vermehrt. Die Bildung der Bernsteinsäure geht mit der Erzeugung des Alkohols und also auch mit der Zersetzung des Zuckers Hand in Hand. Bei der unterbrochenen Gärung und bei 35° verhält sich allerdings der Alkohol zur Bernsteinsäure wie 100 : 0,439, die drei folgenden Unterbrechungen zeigen aber das Verhältnis wie 100 : 0,875, 100 : 0,89 und 100 : 0,823, so daß sich hier ein Unterschied nicht ergibt. Vergleichen wir Glycerin- und Bernsteinsäurebildung miteinander, so erhellt, daß niedrige Temperatur auf die Erzeugung dieser Säure ohne Einfluß ist, während die Menge des Glycerins dadurch vermindert wird. An- oder Abwesenheit von Nährstoffen ist ohne Wirkung auf die Bildung der Bernsteinsäure, während eine reichliche Ernährung der Hefe eine Vermehrung des Glycerins hervorruft. (Durch diese Ueberernährung der Hefe wird wahrscheinlich eine Anreicherung an Fett in der Hefe bewirkt, welches im weiteren Verlaufe der Gärung wieder gespalten wird; vergl. S. 381.) Die Bernsteinsäure bildet sich unabhängig vom Glycerin, und die PASTEUR'sche Gleichung (s. S. 378) ist nicht zutreffend.

Auch nach STRAUB (1) vollzieht sich die Bildung der Bernsteinsäure gesondert von der Entstehung des Glycerins.

Wie bei der Entstehung des letzteren, so nimmt DUCLAUX (1) ebenfalls für die Erzeugung der Bernsteinsäure ein besonderes Enzym an, ohne diese Hypothese durch Beweise zu stützen.

Bei der Gärung mittelst Hefenpreßsaftes wird Bernsteinsäure erzeugt. Vor der Gärung waren in 1250 ccm Preßsaft 0,2 g Bernsteinsäure enthalten, nach der Vergärung von 100 g Rohrzucker fanden BUCHNER und RAPP (2) 0,5 g Bernsteinsäure, es hatten sich somit 0,3 g neu gebildet.

Ueber die Quelle der Bernsteinsäure sind die Ansichten noch keineswegs geklärt. Wie beim Glycerin nehmen auch hier die meisten Forscher den Zucker als Grundstoff an, doch ist es auffällig, daß stets nur geringe Mengen dieser Säure bei wechselnden Gärungsbedingungen entstehen. Auch im Bier ist wenig Bernsteinsäure vorhanden; so wies

Straub (1) hier 0,0026—0,0039 Proz. nach. Nach Blumenthal (1) erzeugen Mikroorganismen sowohl aus Kohlenhydraten wie aus Eiweiß Bernsteinsäure. Grüss (2) glaubt deshalb, daß die Quelle für die letztere im Asparagin zu suchen sei. Durch die Oxydase der Hefe würde das Asparagin zunächst in Asparaginsäure übergeführt und diese dann in Aepfelsäure gespalten, entsprechend der Gleichung

$$2 \underset{\text{Asparagin}}{\begin{matrix} CH_2 - CO(NH_2) \\ | \\ CH(NH_2) - COOH \end{matrix}} + 3O_2 = 2 \underset{\text{Aepfelsäure}}{\begin{matrix} CH_2 - COOH \\ | \\ CH(OH) - COOH \end{matrix}} + 2N_2 + 2H_2O.$$

Da neben der Oxydase in der Hefenzelle auch ein Reduktionskörper vorhanden ist (s. Bd. I, S. 258), so könnte dieser die Hydroxylgruppe aus der Aepfelsäure herausnehmen, wodurch dann Bernsteinsäure $COOH—CH_2—CH_2—COOH$ entstehen würde. Nach der Grüss'schen Hypothese müßte sich freier Stickstoff bilden, der bei der Alkoholgärung noch nicht aufgefunden worden ist. Sehen wir zu, in welchem Mengenverhältnis dieses Element gegenüber der Kohlensäure auftreten könnte. Unter Zugrundelegung der Zahlen von Pasteur würde 1 g Zucker 464 mg Kohlensäure und 7,6 mg Bernsteinsäure ergeben. Bei der Bildung der letzteren würden nach der Grüss'schen Formel 1,8 mg Stickstoff frei. In Volumen umgerechnet, würden diese Mengen bei 15° und 760 mm Barometerstand 253 ccm Kohlensäure und 1,5 ccm Stickstoff, oder rund 0,6 Proz. des Gases ergeben. Pasteur (2), der die Kohlensäure gasvolumetrisch bestimmte, erwähnt nichts von etwa vorhandenem Stickstoff, allerdings bezeichnet er seine Versuche selbst als sehr heikler Natur. Der Stickstoff, der bei einer geringeren Menge an produzierter Bernsteinsäure im Prozentgehalt des Gärungsgases sinken würde, könnte der Bestimmung entgangen sein. Um die Grüss'sche Hypothese zu stützen, müßten die Gärungsgase auf einen Gehalt an freiem Stickstoff untersucht werden, der in bestimmtem Verhältnis zu der gebildeten Bernsteinsäure stehen müßte. Ferner muß auch der Nachweis noch erbracht werden, daß Hefe aus Asparagin tatsächlich Bernsteinsäure erzeugt.

Oxalsäure bildet sich bei der Gärung mittelst verschiedener Organismen, z. B. auch des *Saccharomyces Hansenii* Zopf (1); vergl. S. 181. Bei der Alkoholgärung durch Hefen ist Oxalsäure mit Sicherheit nicht aufgefunden worden. Indessen bemerkt man in der Hefe beim Mikroskopieren häufig Oxalatkristalle (vergl. S. 88), deren Gegenwart Prior (1) auf die Bildung geringer Mengen von Oxalsäure bei der Gärung deutet. Ob aber dieselbe aus dem Zucker entsteht oder bereits in der vergorenen Lösung vorgebildet war, ist ganz ungewiß.

Im Jahre 1856 fand Dubrunfaut (1) bei gewissen Gärungen die **Milchsäure** auf, indessen ist zu beachten, daß dieser nicht mit reiner Hefe arbeitete. Milchsäurebakterien sind weit verbreitet; es können also nur jene Versuche in Betracht kommen, bei denen zum mindesten eine bakterienfreie Hefe benutzt wurde. Pasteur (1) fand bei den Gärungen mit seiner Reinhefe Milchsäure nicht auf; nur in einem Falle erwähnt er, daß sich eine sehr kleine Quantität des Zuckers in Milchsäure verwandelte. Effront (2) glaubt die Entstehung der Milchsäure auf eine Umwandlung der Eiweißkörper zurückführen zu können. Bei der Vergärung des Zuckers durch Hefenpreßsaft hatte Ahrens (1) eine nicht flüchtige Säure bemerkt, die er als Milchsäure ansprach. Doch erst die Untersuchungen von Buchner und Meisenheimer (1) er-

gaben mit Sicherheit, daß die Milchsäure ein ständiges Nebenprodukt der Alkoholgärung ist und aus dem Zucker entsteht; vergl. S. 353.

§ 87. Flüchtige Säuren und Aldehyde als Nebenprodukte der Alkoholgärung. Der Einfluſs des Sauerstoffes auf die Gärung.

5 Die im § 86 erwähnten Säuren werden unter der Bezeichnung der nicht-flüchtigen, fixen oder festen Säuren zusammengefaßt. In der Zymotechnik stellt man ihnen die flüchtigen Säuren gegenüber, welche, soweit sie in Gärprodukten aufgefunden sind, sämtlich der Fettsäurereihe angehören. Prior (2) ließ die gleiche Bierwürze durch 17 verschiedene 10 Reinhefen vergären und ermittelte in den resultierenden Bieren den Säuregehalt. Die Menge der gebildeten organischen festen Säuren gebrauchte für 100 ccm Bier bei den einzelnen Hefen 2.1—5.4 ccm Zehntel-normal-Natronlauge, die der flüchtigen Säuren 2.1—5.8 ccm der Lauge. Auf 100 ccm Lauge zur Neutralisation der festen organischen Säuren 15 treffen zur Neutralisation der flüchtigen Säuren bei den verschiedenen Hefen 52,4—180.9 ccm Lauge. Der Säuregehalt schwankt also bei den einzelnen Hefenrassen in weiten Grenzen. Nach Alfr. Rau (1) nimmt die Menge der flüchtigen Säuren bei höherer Gärtemperatur (35°) bedeutend zu, und Preßhefe erzeugt mehr flüchtige Säure als Bierhefe. Bei Luft-20 zutritt ist die Vermehrung dieser Säuren, wie Straub (1) fand, eine stärkere als bei Luftabschluß. Ihre Menge ist nach Biourge (1) unabhängig von der Menge des gebildeten Alkohols. Die Konzentration der gärenden Flüssigkeit übt keinen merklichen Einfluß auf ihre Erzeugung aus, dagegen wächst ihre Menge proportional der Gärdauer, zumal, wenn 25 man die vollständig vergorene Lösung noch längere Zeit aufbewahrt. Besonders auffällig ist diese Erscheinung nach Amthor (2) bei dem *Saccharomyces apiculatus*; vergl. S. 327.

Die **Ameisensäure** ist das erste Glied der flüchtigen Säuren. Kruis und Rayman (2) haben sie schon im Jahre 1891 in Bieren bemerkt, die 30 jahrelang über der Hefe gestanden hatten (s. S. 18). Auch in sterilisierten Bierwürzen fanden sie nach längerer Zeit diese Säure vor, so daß sie deren Bildung einem in der Würze selbst stattfindenden Chemismus, vielleicht einer Umwandlung von Eiweiß, zuschrieben. Khoudabachian (1) konstatierte in frischem Traubenmost die Gegenwart der 35 Ameisensäure, deren Menge während der Gärung bei schlechten Lebensbedingungen der Hefe zunahm. In Spuren kommt sie zufolge Liebermann (1) und Kiticsán (1) auch in normalen Weinen vor, doch verschwindet sie leicht, wie schon Duclaux (3) beobachtete, in Gegenwart von Hefe. Nach Thomas (1) findet sich Ameisensäure z. B. in wässerigen 40 Aufgüssen von Malzkeimen; doch auch bei der Gärung entsteht sie. Eine starke Bildung derselben tritt bei der Gärung mit großer Oberfläche und in Gegenwart von Stickstoffverbindungen ein. Von letzteren ist hauptsächlich Harnstoff allein oder im Gemisch mit Ammoniumbikarbonat geeignet, die Menge der Ameisensäure zu vermehren, welche noch durch 45 Zusatz von kohlensaurem Kalk gesteigert werden kann. Auch bei der zellenfreien Gärung fanden Buchner und Meisenheimer (1) Spuren einer flüchtigen Säure, welche große Aehnlichkeit mit Ameisensäure aufwies. Daß letztere oft unter den Produkten der Bakteriengärung zu finden ist, werden wir noch im § 90 sehen.

50 Die **Essigsäure** war schon frühzeitig als Nebenprodukt der Alkohol-

gärung von LAVOISIER (1) bemerkt worden. DUCLAUX (4) und BÉCHAMP (1) fanden ebenfalls regelmäßig Essigsäure, doch nur in Spuren; auch SCHÜTZENBERGER (1) bestätigt diese Beobachtungen. Die Essigsäure kann natürlich nur bei Verwendung einer bakterienfreien Hefe als Nebenprodukt der Alkoholgärung betrachtet werden, denn Essigsäurebakterien 5 sind weit verbreitet; es gilt hier die gleiche Bemerkung, die in betreff der Milchsäure auf S. 383 gemacht worden ist. KRUIS und RAYMAN (2) hatten Essigsäure überhaupt nicht aufgefunden, trotzdem sie ihr besonderes Augenmerk auf diese Säure richteten. THOMAS (1) indessen erhielt stets Essigsäure, obgleich nur in Spuren. BUCHNER und MEISEN- 10 HEIMER (1 u. 2) fanden auch bei der Gärung mittelst bakterienfreien Hefenpreßsaftes stets Essigsäure auf; es steht somit endgültig fest, daß dieselbe ein normales Nebenprodukt der Alkoholgärung ist. Die Preßsäfte enthielten vor der Gärung 0,004—0,010 Proz. Essigsäure, nach derselben 0,08—0,33 Proz., so daß während der Gärung beträchtliche 15 Mengen neu gebildet worden waren. Diejenigen Hefenpreßsäfte, welche Milchsäure vergoren, lieferten viel Essigsäure, während das umgekehrte bei solchen der Fall war, die reichlich Milchsäure erzeugten. Dem Hefenenzym, welches den Traubenzucker vermutlich in drei Moleküle Essigsäure spaltet, wird der Name Glucacetase beigelegt. Ueber die 20 Entstehung der Essigsäure stellt BIOURGE (1) die Hypothese auf, daß die flüchtigen Säuren nicht als das Ergebnis einer Zuckerspaltung sondern als Folge von Assimilationsvorgängen anzusehen seien; denn Hefe für sich liefert bei der Destillation eine beträchtliche Säuremenge. Nach PRIOR (1) liegt aber die Annahme viel näher, daß — und hierauf 25 deuten die Versuche von GILTAY und ABERSON (1) hin — der bei der Gärung verbrauchte Sauerstoff im Innern der Hefenzelle einen Teil des gebildeten Alkohols oxydiert. Der Einfluß des Sauerstoffes auf die Gärung, auf den wir auf S. 386 zurückzukommen haben werden, spielt also hier herein. Die Entstehung der Essigsäure bei der Alkoholgärung 30 ist aber nicht seiner Wirkung ausschließlich zuzuschreiben; denn die Versuche von BUCHNER und MEISENHEIMER (1) haben bewiesen, daß diese Säure ein normales Nebenprodukt der Alkoholgärung ist. Allerdings entsteht sie als solches nur in geringer Menge, allein bei hoher Zuckerkonzentration von 30—40 Proz. der Lösung erscheint sie nach THYLMANN 35 und HILGER (1) vermehrt. Tritt sie sonst in erheblicherer Menge auf, so ist ihre Bildung wohl einer Oxydation des Alkohols, eventuell unter Mithilfe von Bakterien zuzuschreiben. Auch in den Fuselölen kommt Essigsäure vor, aber nur in geringer Menge.

Das dritte Glied der Fettsäurereihe ist die **Propionsäure,** welche 40 WINKLER (1) und BÉCHAMP (2) in kranken Weinen auffanden. Auch im Cognac kommt sie in Form eines Esters nach ORDONNEAU (1) zuweilen vor. Sie entsteht zufolge STRECKER (1) und KRAMER (1) durch gewisse Gärungen aus der Milchsäure, was zu erwähnen ist, da ja Milchsäure (s. S. 383) ein normales Nebenprodukt der Alkoholgärung ist. 45

Die **Buttersäure,** welche sich, wie bekannt, leicht durch bestimmte Bakterien bildet, ist in geringer Menge entweder frei oder häufiger als Ester durch DUCLAUX (5) und ORDONNEAU (1) im Cognac, durch K. WINDISCH (3) im Kartoffelfuselöl und durch letzteren (4) auch im Kirschbranntwein nachgewiesen worden. 50

Valeriansäure fanden KRUIS und RAYMAN (2) in einer sterilisierten Würze, die jahrelang gestanden hatte; sie schrieben die Entstehung derselben, sowie der anderen noch zu erwähnenden höheren Fettsäuren

der Zersetzung der zusammengesetzteren stickstoffhaltigen Nährstoffe, z. B. des Eiweißes, zu. Auch in kranken Weinen findet sie sich zuweilen nach DUCLAUX (5).

Von den höheren Fettsäuren kommen die Capronsäure, die 5 Caprylsäure, die Pelargonsäure und die Caprinsäure, an Alkohole in Esterform gebunden, in den Fuselölen, die wir im nächsten Paragraphen zu betrachten haben, und im Cognac vor, die Oenanthylsäure nur im Wein, beziehungsweise im Cognac. Man vergl. darüber PELOUZE und LIEBIG (1), DELFFS (1), FEHLING (1), A. FISCHER (1), 10 GRIMM (1), DUCLAUX (5), ORDONNEAU (1), K. WINDISCH (3 u. 4), KRUIS und RAÝMAN (2) und SCHÜPPHAUS (1).

In den Estern sind zufolge K. WINDISCH (3), wenn wir die Gesamtmenge der Fettsäuren gleich 100 setzen, an letzteren enthalten: im Kartoffelfuselöl 3,5 Essigsäure, 0,5 Buttersäure, 14 Capronsäure, 15 34 Caprylsäure, 12 Pelargonsäure und 36 Caprinsäure, im Kornfuselöl 2,7 Essigsäure, 0,4 Buttersäure, 13,2 Capronsäure, 26,7 Caprylsäure, 12,9 Pelargonsäure und 44,1 Caprinsäure. HILGER (1) fand außerdem Stearinsäure, Palmitinsäure und Laurinsäure in einem Kornfuselöle. Diese Säuren stammen zweifellos aus zersetztem Fett, 20 und ebenso ist es sehr wahrscheinlich, daß auch die übrigen höheren Fettsäuren, von der Buttersäure bis zur Caprinsäure, aus dem in der Maische und in den Hefenzellen enthaltenem Fett (s. S. 381) durch Spaltung mittelst der Hefenlipase entstanden sind; vergl. BAU (1).

Als Zwischenkörper zwischen den Fettsäuren und den Alkoholen 25 sind die **Aldehyde** aufzufassen, welche regelmäßig bei der Gärung entstehen. Den gewöhnlichen Aldehyd oder Acetaldehyd fanden schon BÉCHAMP (1) und RÖSER (1) auf. Auf die Ursache seiner Entstehung kommen wir auf S. 389 u. 393 noch zurück. Man kann ihn, wie DURIN (1) erprobt hat, leicht gewinnen, wenn man die Gärungsgase in geeigneten 30 Gefäßen einer starken Abkühlung unterwirft. In den Lufthefenfabriken wird unter dem Einfluß des Luftsauerstoffes ebenfalls viel Aldehyd erzeugt, besonders in Maischen, die aus Mais, Roggen und Malz hergestellt sind, so daß der gewonnene Spiritus infolge seines hohen Aldehydgehaltes einen schlechten Geruch und Geschmack besitzt; vergl. 35 MAERCKER (2). Auch nach JAKSCH (1) bildet sich bei der Alkoholgärung Aldehyd. KAYSER (1) hält den Aldehyd für ein Produkt der Tätigkeit der Saccharomyceten; nach KRUIS und RAÝMAN (2) bilden sich bedeutende Mengen dieses Körpers, wenn gleichzeitig Kahmhautbildung erfolgt und die Luft reichlich Zutritt hat. Der Aldehyd hat mithin seinen Ursprung 40 in der Oxydation des Alkoholes in statu nascendi. Nach ILGES bildet er sich nicht bei der Gärung, sondern erst in den Destillierapparaten durch Berührung der Spiritusdämpfe mit Luft; vergl. MAERCKER (3). Das Acetal, der Diäthyläther des Aldehyds, $CH_3 \cdot CH(OC_2H_5)_2$, entsteht chemisch neben Aldehyd bei der Oxydation des Alkohols. Auch 45 in Gärprodukten findet es sich nach GEUTHER (1) und K. WINDISCH (4) und kommt im Cognac zufolge ORDONNEAU (1) in nicht unbeträchtlicher Menge vor. Seine Bildung ist leicht zu erklären. Bei der Erzeugung des Aldehyds nach DURIN (1) treffen Aldehyd und Alkohol im Entstehungszustand zusammen und können sich unter Austritt eines Mole-50 küles Wasser zu Acetal vereinigen. —

Der **Einfluſs des Sauerstoffes** auf die Alkoholgärung durch Hefen, auf den wir schon auf S. 385 hingewiesen haben, ist nun noch in Betracht zu ziehen. Ueber den Sauerstoffverbrauch für die Zwecke der

Zellvermehrung und der Atmung hingegen sind bereits auf S. 121 u. f. ausführliche Angaben gemacht worden. Es sei hier noch bemerkt, daß in der Praxis schon lange die günstige Einwirkung der Lüftung auf die Vergärung von Most, Würze und Maische bekannt ist. Eine Reihe von Gärungstechnikern hat dies in den Jahren 1867—1874 außer Zweifel 5 gestellt, so zunächst auf unvollkommene Weise BLANKENHORN, dann MORITZ, zum Teil in Gemeinschaft mit HAAS, ferner MOLNÁR an Weinmosten und ADOLF MAYER (1) in künstlichen Nährlösungen. Genauere Versuche unternahm R. PEDERSEN (1) im Jahre 1878 unter Verwendung von Würze. Es ließ sich erkennen, daß durch das Lüften sowohl die 10 Stärke der Extraktverarbeitung als auch die Hefenvermehrung (absolut genommen) gesteigert werden, daß jedoch die auf die Gewichtseinheit der Ernte bezogene Menge von verschwundenem Extrakte in den gelüfteten Würzen geringer ausfalle als in den nicht gelüfteten. Doch ist, wie D. IWANOWSKI (1) im Jahre 1893 durch rechnerische Ueberprüfung 15 dieser Befunde zeigte, der Unterschied nicht groß. E. CHR. HANSEN hat (s. S. 122) PEDERSEN's Versuch wiederholt und gefunden, daß die auf je eine Zelle der Ernte bezogene Menge des verschwundenen Extraktes sich in den gelüfteten Kulturen geringer erwies als in den nicht gelüfteten. Allerdings können die Ergebnisse dieser Versuche nicht als 20 völlig einwandfrei gelten, denn auch Nebenwirkungen machen sich beim Durchleiten der Luft bemerkbar. Hierdurch wird in der Flüssigkeit eine Erschütterung hervorgebracht, welche auf die Zellvermehrung anregend einwirkt. Die Gärtätigkeit selbst hingegen erleidet nach RAPP (1) durch heftige Erschütterung eine Herabstimmung, so daß dadurch jene 25 Begünstigung zu einem vorläufig noch unbestimmbaren Teile ausgeglichen wird. Eine dritte Nebenwirkung liegt darin, daß die durchstreichende Luft auch flüchtige Stoffwechselprodukte, darunter solche schädlicher Natur, mit sich fortführt und so den Nährboden in je nach den Umständen verschiedenem Grade entgiftet. Dieser begünstigenden Neben- 30 wirkung entbehren alle jene Parallelversuche, bei denen überhaupt keine oder eine nicht gleich starke Durchspülung mit einem indifferenten Gase stattfand. Verwendet man als derartiges Gas Wasserstoff (der in absolut reinem Zustande äußerst schwierig zu beschaffen ist), so hat man mit der von KORFF (1) bemerkten Verschiedenartigkeit der entstehenden 35 Säuren gegenüber jenen in den gelüfteten Zuchten zu rechnen, was leicht einzusehen ist, da ja der Sauerstoff der Luft auch eine rein chemische Wirkung ausübt.

Eine große Erschwerung und Verwicklung erwächst der Aufgabe der Untersuchung des Einflusses des Sauerstoffes auf die mittelst Hefen- 40 zellen durchgeführte Alkoholgärung dadurch, daß jene durch dieses Gas zu kräftiger Vermehrung angeregt werden. Diese Störung hintanzuhalten, war A. J. BROWN (1) bemüht. Ausgehend von der durch ihn gemachten Beobachtung, daß in einem Würzequantum, in welches man mehr Zellen gebracht hat, als darin aus minimaler Aussaat heranwachsen 45 würden, keine nennenswerte Hefenvermehrung sich einstellt, hat er derart starke Aussaaten in mit Glucose versetztem Hefenwasser angelegt und entweder Luft oder Wasserstoff oder Kohlensäure durch die Lösung geleitet. Die Untersuchung ergab, daß bei einer im Vergleiche zum Anfangszustand fast ungeänderten Zahl der Zellen zu Ende des Versuches 50 in den gelüfteten Kulturen mehr Zucker vergoren war. Die aus diesen Beobachtungen gezogene Schlußfolgerung, daß die gleiche Anzahl Hefenzellen von nahezu gleich großem Gesamtgewicht bei Anwesenheit

von Luft mehr Zucker vergärt, als ohne solche, hat durch Duclaux (6) rechnerische Anfechtung erfahren, welche jedoch durch Brown (2) zurückgewiesen worden ist.

Brown's Versuche bedürfen, worauf auch H. van Laer (2) und 5 Iwanowski (1) hinweisen, der Ueberprüfung: die Voraussetzung, auf welcher sie aufgebaut sind, ist der allgemeinen Erfahrung zuwider. Das Ausbleiben der Vermehrung der übergroßen Aussaat muß wohl mit einer ungünstigen Beschaffenheit des Nährbodens in jenen Versuchen erklärt werden. Wie sehr gerade dieser Umstand sich geltend machen kann, 10 darüber belehren uns Versuche von N. von Chudiakow (1). Dieser Forscher meint, dem Sauerstoff einen hemmenden Einfluß auf die Alkoholgärung nachsagen zu können. Ganz außer acht gelassen ist auch der Umstand, daß während der Gärung Zellen absterben und zum Teil vergehen, sich auflösen, so daß aus dem Befunde der gleichen Hefenmenge 15 vor und nach der Gärung nicht mit Sicherheit auf das Ausbleiben der Zellvermehrung geschlossen werden darf. Durch eine übergroße Aussaat an Hefe wird auch die Zusammensetzung des Nährbodens geändert, da lösliche Stoffe aus der Hefe diffundieren, in erhöhtem Maße aus den abgestorbenen Zellen; ob diese Aenderung eine gleichbleibende ist, wenn 20 durch die Lösung Luft oder Kohlensäure oder nicht immer einwandfrei reiner Wasserstoff gepreßt wird, ist noch eine offene Frage.

Wenngleich das Ergebnis der Mehrzahl dieser Versuche dahin zu deuten wäre, daß bei Zutritt von Sauerstoff die von der Hefeneinheit geleistete Arbeit geringer ausfällt, und daß demnach der Sauerstoff auf 25 die Gärung selbst hemmend einwirkt, so kann doch keiner der Versuche als beweiskräftig angesehen werden. Denn bei keinem derselben hat man die für solchen Anspruch unerläßliche Forderung zu erfüllen vermocht, daß jedwede Zelle während der gesamten Dauer des Versuches jederzeit der Einwirkung des Sauerstoffes ausgesetzt war. In den 30 flüssigen Zuchten bilden sich häufig Zellverbände in Gestalt kleiner Klümpchen, in deren Inneres der Sauerstoff nicht mit für uns wahrnehmbarer Sicherheit gelangt. Die Zellen dort führen mithin einen ganz anders beschaffenen Stoffwechsel als die den aufsteigenden Luftblasen zugekehrten Zellen am Umfange des Zellverbandes. In noch höherem 35 Maße trifft dieser Einwand alle Zuchten auf festen Nährböden, also auch Strichkulturen auf Zuckergelatine. In solchen sind die Zellschichten unterhalb der Oberfläche so gut wie ganz von dem über diese letztere hinwegstreichenden Sauerstoff abgesperrt. Entscheidung hierüber könnten nur Versuche bringen, welche in zellenfreier Gärung mit Zymase selbst 40 angestellt werden. Die Frage also, ob der Sauerstoff die durch Hefen erregte Gärung in dem einen oder anderen Sinne beeinflußt, ist als noch nicht endgültig beantwortet zu bezeichnen.

Die Erfahrung der Praxis der Alkoholgewinnung steht zu den oben gemachten Darlegungen nicht im Widerspruch. Die als notwendig oder 45 als nützlich erkannte Lüftung von gärenden Maischen, insbesondere der Melassenbrennereien und Lufthefenfabriken, hat nicht etwa die Steigerung der Gärkraft der einzelnen Zelle sondern die Förderung der Vermehrung der Aussaat zum Hauptzwecke. Eine Fortsetzung des Lüftens über die Erreichung dieses Zieles hinaus beabsichtigt die Ausnützung der auf 50 S. 387 angedeuteten günstigen Nebenwirkungen einer solchen Behandlung. Weises Maßhalten ist jedoch auch hier geboten, sonst macht sich eine andere Nebenwirkung stark verlustbringend geltend, das ist die Verflüchtigung von Alkohol. An dieser Stelle sollte nur der Deutung vor-

gebeugt werden, als ob die Tatsache der Beschleunigung und Erhöhung der Vergärung eines flüssigen Nährbodens durch Lüften eine Stütze für die Behauptung von der Aneiferung der Gärung durch Sauerstoff abgeben könne. Die Menge des durch die entweichende Kohlensäure mitgeführten Alkohols hat schon Eck (1) im Jahre 1875 an Brennereimaischen studiert. In den durch Riss (1) dann angestellten Versuchen mit gezuckerter Mineralsalz-Nährlösung betrug der Verlust 1,12 Proz., bezogen auf die in der vergorenen Flüssigkeit vorhandene Alkoholmenge.

Schließlich seien noch einige Worte über die von Pasteur vertretene Auffassung der Alkoholgärung als eines Lebens ohne Luft (s. Bd. I, S. 18) angefügt. Die experimentelle Grundlage, auf welche diese Theorie in bezug auf Hefen sich stützt, hat schon Nägeli (1) für unhaltbar erklärt. Die Behauptung, daß bei Zutreten reichlicher Mengen Sauerstoffes zu Zuchten von Hefe diese letztere nur wie ein atmender Fadenpilz sich entwickele und Alkolgärung nicht vollführe, ist nicht bewiesen, es würde hierzu die Feststellung der Beziehungen zwischen entbundener Kohlensäure, entstandenem Alkohol und erzeugter Hefenmenge gehören. Einer derartigen Forderung zu entsprechen, haben sich erst Giltay und Aberson (1) bemüht. Einwände lassen sich allerdings auch gegen deren Versuche erheben, wenngleich nicht in jener Richtung, wie sie Duclaux (6) in einer dann durch Giltay (1) zurückgewiesenen Kritik gefunden zu haben glaubte. Jenes Forscherpaar hat feststellen können, daß selbst in sehr reichlich gelüfteten Hefenzuchten, in welchen auch kräftige Atmung sich abspielte, immerhin noch über 60 Proz. des insgesamt verarbeiteten Zuckers zu Alkohol und Kohlensäure vergoren wurden. Buchner und Rapp (4) sind zu einem ähnlichen Ergebnisse gelangt. Doch sind die einen wie die anderen Versuche nicht von unbedingter Beweiskraft, sondern lassen nur einen Wahrscheinlichkeitsschluß ziehen, der also gegen die Richtigkeit von Pasteur's Behauptung spricht.

Ungleich einfacher als dieser physiologische Einfluß liegt die chemische Wirkung des Sauerstoffes bei der Alkoholgärung. Wie schon auf S. 385 erwähnt wurde, oxydiert sich Alkohol leicht zu Aldehyd und Essigsäure. Nach Dubin (1) bildet die bei der Gärung entweichende Kohlensäure einen dichten Schaum, und der auf der großen Gesamtoberfläche der kleinen Gasblasen verteilte Alkohol geht leicht in Aldehyd über. Röser (1) fand ebenfalls die Aldehydmenge bei Luftzutritt gegenüber den bei Luftabschluß durchgeführten Gärungen vermehrt. Jedenfalls äußern auch die Oxydasen der Hefe bei der Sauerstoffübertragung eine Wirkung, zumal, wenn die Hefe zur Hautbildung übergeht. Läßt man eine vergorene Flüssigkeit mit der ganzen Menge Hefe lange Zeit bei Luftzutritt stehen, so wird nach Kruis und Rayman (2) fast der gesamte durch die Gärung erzeugte Alkohol sogar zu Kohlensäure und Wasser oxydiert. Bereits Pasteur (3) hatte darauf hingewiesen, daß beim Lagern des Weines der Luftsauerstoff eine Rolle spiele. Jungwein behält bei sorgfältigem Luftabschluß lange seinen Charakter als Jungwein; welche Stoffe sich mit dem Sauerstoff verbinden, und was entsteht, ist unbekannt. Es ist nach Wortmann (2) fraglos, daß durch den Luftsauerstoff wesentliche Veränderungen beim Lagern des Weines hervorgebracht werden (vergl. S. 386 u. 395), jedoch ist die seit Pasteur geltende Ansicht, daß es sich um Oxydationen handelt, jedenfalls nicht in ihrem ganzen Umfange zutreffend, zum Teil werden wohl physiologische Vorgänge mitspielen. Die Veränderungen, welche im Weine durch den Luftsauerstoff hervorgerufen werden, schreibt Wort-

MANN hauptsächlich der Mitwirkung der Organismen zu. Nach RAPP (1) ist ebenfalls die Esterbildung bei Luftzutritt stärker als bei Luftabschluß, was sich leicht erklären läßt, da die durch Oxydation von Alkoholen gebildete Säure im Entstehungszustand sich leichter mit Alkohol zu Estern verbindet, als bereits vorgebildete Säure dies vermag.

§ 88. Alkohole und Ester (Bouquetstoffe) als flüchtige Nebenprodukte der Alkoholgärung. Anderweitige Nebenprodukte.

Während wir im vorhergehenden Paragraphen diejenigen flüchtigen Nebenprodukte einer Betrachtung unterzogen, welche der aliphatischen Reihe angehören und verhältnismäßig viel Sauerstoff und wenig Wasserstoff enthalten, wie die flüchtigen Säuren und die Aldehyde, deren allgemeine Formeln $C_nH_{2n}O_2$ und $C_nH_{2n}O$ sind, gelangen wir zunächst zu der Besprechung von Körpern der Formel $C_nH_{2n+2}O$, deren erstes Glied der *Methylalkohol*, $CH_3.OH$, ist. Dieser entsteht häufig bei Bakteriengärungen (s. § 90), doch kann er auch bei der Alkoholgärung durch Zersetzung vorgebildeter Körper, der Glycoside, auftreten, auf welchen Umstand auf S. 395 zurückzukommen sein wird.

Ueber das zweite Glied, den Aethylalkohol, das eine Hauptprodukt der Gärung, wolle man im § 85 nachlesen.

Die *höheren Alkohole* sind im Cognac und in den Fuselölen, die SCHEELE (1) im Jahre 1785 entdeckte, zahlreich vertreten. Sie finden sich im freien Zustande, doch auch oft in Esterform an Fettsäuren gebunden vor.

Den *primären Propylalkohol*, $CH_3.CH_2.CH_2.OH$, erhielt CHANCEL (1) aus dem Fuselöl des Weintreberbranntweins, ebenso auch FITTIG (1); er findet sich zufolge K. WINDISCH (3 u. 4), KRUIS und RAÝMAN (2) und ORDONNEAU (1) regelmäßig im Kartoffel- und Kornfuselöl, im Kirschbranntwein und im Cognac.

Sekundären oder *Isopropylalkohol*, $CH_3.CH(OH).CH_3$, glaubte BERTHELOT (1) erhalten zu haben; RABUTEAU (1) fand ihn im Kartoffelfuselöl.

Normaler Butylalkohol, $CH_3.(CH_2)_2.CH_2.OH$, entsteht nach FITZ (1) und EMMERLING (1) durch Spaltpilzgärungen des Glycerins, des konstanten Nebenprodukts der Alkoholgärung. RABUTEAU (1) isolierte ihn aus Kartoffelfuselöl, EMMERLING (1) aus Kornfuselöl, ORDONNEAU (1) aus Cognac. Er ist nach ORDONNEAU wahrscheinlich ein normales Gärprodukt der Weinhefe, während Bierhefe, die andere sekundäre Körper ergibt, den *Isobutylalkohol* $(CH_3)_2.CH.CH_2.CH_2(OH)$ erzeugt. Letzteren erhielt schon WURTZ (1) aus dem Fuselöl der Maischen von Runkelrüben, Kartoffeln und Getreide; ebenso fanden ihn PIERRE und PUCHOT (1), ferner K. WINDISCH (3 u. 4), RABUTEAU (1), sowie KRUIS und RAÝMAN (2).

Primärer Pentyl- oder *Amylalkohol*, $CH_3\cdot(CH_2)_3\cdot CH_2(OH)$, scheint nach WYSCHNEGRADSKY (1) neben den isomeren Amylalkoholen im Fusel vorzukommen.

Der *Gärungsamylalkohol* oder *Isoamylalkohol* macht die Hauptmenge des Fuselöles aus. Er tritt als gewöhnlicher, *optisch inaktiver* Alkohol $(CH_3)_2\cdot CH\cdot CH_2\cdot CH_2(OH)$ auf, doch ist er zufolge MARCKWALD (1) stets mit dem *aktiven* Alkohol

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \cdot CH_2 \end{matrix} \!\!>\! CH \cdot CH_2(OH)$$

vergesellschaftet, welcher die Ebene des polarisierten Lichtes nach links dreht. Unter der Einwirkung von Schimmelpilzen geht er nach Le Bel in eine rechtsdrehende Form über (s. Bd. I, S. 436). Den Namen Amylalkohol legte ihm Cahours (1) bei, weil er aus stärkemehlhaltigen Materialien erzeugt wird. Die Amylalkohole finden sich in sämtlichen technischen Fuselölen, in geringerer Menge auch im Cognac; man vergleiche auch außer der bereits erwähnten Literatur die Autoren Pedler (1), Krutzsch (1 u. 2), Balard (1) und Halenke und Kurtz (1).

Zur Erklärung der **Bildung** der **Fuselöle** sind verschiedene Hypothesen aufgestellt worden. Nach Brefeld (1) entstehen Nebenprodukte, sobald die Hilfsmittel zu weiterem Wachstum der Hefe erschöpft sind, die Hefe abstirbt: es treten dann bei fortdauernder Gärung Zersetzungen ein. Entstammen die höheren Alkohole der normalen Gärung, so muß während der verschiedenen Perioden derselben nach Lindet (1) ihre Menge zur Quantität des gebildeten Aethylalkoholes konstant sein. Dies ist nicht der Fall. Auf 100 Teile Alkohol treffen in den ersten vierzehn Stunden 0,36, in 24 Stunden aber 14,07 ccm Fuselöle. Die Vermehrung der letzteren scheint durch Mikroorganismen bedingt zu sein, welche erst nach beendeter Gärung zur vollen Wirkung gelangen. Höhere Alkohole sind die Produkte einer sekundären Gärung, sie entstehen in geringerem Grade, wenn man die Gärung durch Vermehrung des Hefensatzes oder durch Zusatz steriler Bierwürze beschleunigt.

Daß Bakterien Fuselöle erzeugen können, ist durch Perdrix (1) sichergestellt, der aus Seinewasser ein Amylalkohol produzierendes Bakterium isolierte. Péreire und Guignard (1) fanden in kalkhaltigen Wässern einen solchen Bazillus, den sie sogar technisch zu verwerten gedachten. Auch Pringsheim (1) beschreibt einen von amerikanischen Kartoffeln isolierten Bazillus, der Amylalkohol erzeugt. Wir werden auf diese und andere Bakteriengärungen näher in dem § 90 eingehen; hier sei nur erwähnt, daß zum mindesten Perdrix' Bazillus so wenig Amylalkohol produziert, daß er nicht als alleinige Ursache der Bildung von Fuselölen gelten kann. Die Versuche Lindet's (2), die ergaben, daß trotz wechselnder Bedingungen die Menge der erzeugten höheren Alkohole annähernd gleich blieb, ließen sich durch Bakteriengärungen erklären, trotzdem eigentlich nicht einzusehen ist, warum gerade die Bakterien durch diesen Wechsel der Bedingungen nicht in ihrer Tätigkeit beeinflußt werden sollten. Beweiskräftiger für Bakterienwirkung bei der Bildung des Fuselöles sind die Versuche von Gayon und Dupetit (1). Die Menge des erzeugten Fusels kann erheblich durch Zusatz baktericider Stoffe oder durch starkes Lüften, welches anaerobe Bakterien unterdrückt, vermindert werden. Es ist hierbei zu beachten, daß in fast allen Fällen mit Ausnahme des sogen. Amyloverfahrens (s. 13. Kap. d. V. Bds.) nicht oder nicht vollständig sterilisierte (Malzzusatz!) Wein-, Kartoffel- und Getreidemaischen zur Vergärung gelangen, so daß durch die Maischen bereits Bakterien in die Gärung eingeführt werden.

Bezüglich der Bierbrauerei, die zumeist die Würzen sterilisiert, findet man in der Literatur nur vereinzelte Angaben über die Bildung höherer Alkohole bei der Gärung. Chapman (1) destillierte sechs englische Biere und fand auf 100 Teile rohen Alkoholes 0,051—0,250 Teile Fuselöl als Amylalkohol, 0,021—0,052 Teile Ester, hauptsächlich Essig-

säure-Aethylester, sowie Spuren von Furol. Wie schon auf S. 390 erwähnt wurde, führt ORDONNEAU (1) die Bildung höherer Alkohole auf die Lebenstätigkeit der Hefen selbst zurück. KRUIS und RAÝMAN (1) suchten die Frage durch Vergärung steriler Würzen mittelst Rein-
5 kulturen von vier verschiedenen Hefen und einer *Mycoderma*-Art zu entscheiden. Alle Versuche mit *Sacch. cerevisiae L*, in welchen es zu einer geringen Fuselbildung kam, wurden mit Zellen ausgeführt, die längere Zeit im Laboratorium unter ungünstigen Bedingungen kultiviert worden waren. Es scheint ein gewisser Grad der Erschöpfung der Hefe zu
10 sein, welcher die Bildung des Amylalkohols zur Folge hat. Dem gegenüber ist aber nach MAERCKER (4) zu betonen, daß Getreidemaischen, welche gerade für die kräftige Ernährung und Vermehrung der Hefe sehr geeignet sind, die Fuselölbildung ganz besonders begünstigen.

Eine hohe Gärtemperatur vermehrt nach KRUIS und RAÝMAN (2)
15 die Fuselöle. In einer spontan milchsauer gewordenen, nur unvollkommen sterilisierten Hefenmaische brachte eine Hefe, die sonst in Malzwürzen keinen Fusel erzeugte, viel Amylalkohol hervor; in einer milchsauren, dann vollkommen sterilisierten Maische entstanden aber durch Hefe bei reichlichem Luftzutritt keine höheren Alkohole. Es wurde
20 ferner konstatiert, daß in allen Fällen, in denen es zur Fuselölbildung kam, nur geringe Mengen von Acetaldehyd entstanden, und umgekehrt. Es scheinen daher wesentlich anaerobiotische Bedingungen zu sein, welche die Bildung der Amylalkohole unterstützen.

Nach GENTIL (1) sind die soeben besprochenen Versuche für die
25 Bildung von Fuselöl durch Hefen nicht beweiskräftig, denn es wirkten die Wahl einer Hefe, die vorher in einem amylalkoholhaltigen Mittel lebte, und die Schädigung der Hefe durch zu hohe Temperatur und Gärung von kurzer Dauer zusammen. GENTIL selbst konnte bei Vergärung einer Rohrzuckerlösung, die als Hefennährstoff Malzpepton ent-
30 hielt, Amylalkohol nicht gewinnen.

In später fortgesetzten Versuchen fanden KRUIS und RAÝMAN (4), abweichend von den zuerst erhaltenen Ergebnissen, daß weder eine ungünstige Zusammensetzung des Nährbodens, noch das Alter und der physiologische Zustand der Hefe die Bildung des Amylalkohols beein-
35 flusse. Letzterer entsteht nur bei Gegenwart gewisser Kohlenhydrate, und zwar besteht die Vermutung, der Amylalkohol bilde sich nicht aus den Hexosen (s. § 89) sondern aus anderen Zuckerarten, die bei der Hydrolyse von Polysacchariden, ständigen Bestandteilen der als Rohstoffe verwendeten Cerealien, entstehen. In zehn Versuchen, zu wel-
40 chen Glucose, Fructose, Rohrzucker und Rübensäfte als Gärmaterial dienten, bildete sich nur Aethylalkohol; bei der Verwendung von Gerstenwürze und invertierten Biertrebern, welche Stoffe Fett enthalten (s. S. 393), wurden indessen beträchtliche Mengen von Amylalkohol erhalten.

45 EMMERLING (5) hingegen behauptet nach seinen vorläufigen Versuchen, daß in reinen bakterienfreien Gärungen Fuselöle nicht oder nur in minimaler Menge entstehen; er schließt aus seinen Experimenten, daß die Amylalkohole ihren Ursprung aus Kohlenhydraten nehmen und durch Bakterien, die weit verbreitet sind und sich fast stets auf Kar-
50 toffelschalen finden, erzeugt werden.

Für die Bildung der Fuselöle ist die Beschaffenheit des zu vergärenden Materiales von großem Einfluß; namentlich ein Fettgehalt

scheint nach BORNTRÄGER (2) ihre Entstehung zu begünstigen. Gärungen mittelst entfetteten Rohmateriales liefern kaum Fusel.

Als Quelle für die Entstehung der höheren Alkohole nimmt man gewöhnlich den Zucker und Kohlenhydrate überhaupt an. Neben dieser Möglichkeit ist aber zufolge BAU (1) eine andere nicht außer acht zu 5 lassen: die Bildung dieser Körper aus dem Fett, welches in den Maischen vorgebildet ist und von der Hefe aus dem Zucker erzeugt, aufgespeichert und wieder gespalten wird. Während der Gärung vollziehen sich außer hydratisierenden Prozessen auch oxydierende und reduzierende Vorgänge. Daneben ist in den technischen Maischen die Gegenwart 10 der Bakterien zu beachten, unter denen sich eine Anzahl befinden, welche mit stark reduzierenden Eigenschaften begabt sind. Nach DURIN (2) entstehen Aldehyde nicht allein durch Oxydation des Alkohols sondern auch durch Reduktionsvorgänge während der Gärung; der Aldehyd könnte dann im Entstehungszustand leicht weiter zu Alkohol re- 15 duziert werden.

Als Quelle für die Entstehung des Propylalkohols ist die Milchsäure anzusehen (s. S. 375), denn dieser Alkohol findet sich zufolge BOUCHARDAT (1) unter den Produkten der Milchsäuregärung; auch bildet er sich nach FITZ (2) bei einer Spaltpilzgärung des Glycerins. 20

Die höheren Alkohole würden nach BAU (1) ihren Ursprung in den aus den Fettarten abgespaltenen Fettsäuren finden; Buttersäure, Capronsäure, Caprylsäure und Caprinsäure sind ja in den Fetten weit verbreitet. Werden die Säuren durch Lipase (s. S. 380) frei, so können sie in statu nascendi bis zu den Alkoholen reduziert werden, zumal in sym- 25 biotischer Gärung zwischen Hefen und Bakterien; gibt es doch viele Organismen, welche sogar freien Wasserstoff abspalten.

Eine Schwierigkeit liegt darin, die Entstehung der Amylalkohole nach dieser Hypothese zu erklären. Diese müßten ihren Ausgangspunkt von den Valeriansäuren nehmen, welche sich nach 30 KRUIS und RAÝMAN (2) neben anderen höheren Fettsäuren aus kompliziert zusammengesetzten stickstoffhaltigen Verbindungen bilden. Wenn sich auch tatsächlich nach BRIEGER (2) Valeriansäure aus Eiweiß abscheiden läßt, so ist doch kaum anzunehmen, daß diese allein das Material für die großen Mengen von Amylalkohol liefert, die sich in den 35 Fuselölen vorfinden. Auf chemischem Wege spalten allerdings Fette beim Destillieren mit überhitztem Wasserdampf nach CAHOURS und DEMARÇAIS (1) Valeriansäure ab. Nach EHRLICH's (1) sehr wichtigen Untersuchungen entstehen jedoch die beiden Amylalkohole aus dem Leucin und Isoleucin, den Spaltungsprodukten vom Eiweiß, unter dem Einfluß 40 der normalen Lebenstätigkeit der Hefe. Das d-Isoleucin bildet die Quelle für den linksdrehenden d-Amylalkohol, während r-Leucin so gespalten wird, daß Isoamylalkohol entsteht und d-Leucin zurückbleibt. Etwa 87 Proz. des l-Leucins werden von der Hefe zu Amylalkohol verarbeitet. Eine andere Quelle für die Bildung des Amylalkohols besteht nach 45 EFFRONT (4) in der Selbstverdauung der Hefe (s. d. 20. Kap.). Der Amylalkohol tritt hierbei erst dann auf, wenn die Selbstverdauung schon sehr weit vorgeschritten ist. Mit dem Absterben der Hefenzellen hört die Zunahme an Amylalkohol auf; zum Beweise, daß die Bildung des Amylalkohols nicht durch die Lebenstätigkeit der Hefe als solcher, 50 sondern durch die Wirkung eines von den lebenden Hefenzellen abgeschiedenen Enzymes bedingt wird. EFFRONT's Ansicht widerspricht also in gewissem Sinne den Ergebnissen der Untersuchungen EHRLICH's, so

daß noch weitere Forschungen über die Bildung des Fuselöles erforderlich sind.

Das Methylpropylcarbinol, $C_3H_7CH(OH)CH_3$, fand RABUTEAU (1) auf. Hexylalkohol, und zwar primärer Isohexyl- oder
5 Caproylalkohol, $(CH_3)_2C_4H_7(OH)$, ist durch FAGET (1) im Fuselöl des Weingeistes aus Weintrebern nachgewiesen worden. Nach K. WINDISCH (3) kommt dieser Alkohol in geringen Mengen im Kornfuselöl, nach KRUIS und RAÝMAN (2) auch im Kartoffelfuselöl vor.

Die Gegenwart geringer Mengen von Heptylalkohol oder
10 Oenanthylalkohol, $C_7H_{15}\cdot OH$, konstatierte K. WINDISCH (3) im Kornfuselöl, FAGET (2) erhielt ihn aus Weintreberbranntwein; es ist möglich, daß der aus letzterem gewonnene Alkohol ein primärer Isoheptylalkohol, $(CH_3)_2\,C_5H_9(OH)$, war.

Endlich wurde noch normaler und auch sekundärer Nonylalkohol,
15 $C_9H_{19}.OH$, von HILGER (1) in einem Kartoffelfuselöle aufgefunden.

Die Fettsäuren und Alkohole, welche während der Gärung entstehen, treten nach ROMMIER (1) in statu nascendi häufig zu chemischen Verbindungen, den Estern, zusammen, auch bilden sie sich bei längerem Lagern gegorener Würzen (Wein) oder Destillaten (Cognac). Zu ihnen
20 gehört ein großer Teil der Bouquetstoffe. An Estern sind die zusammengesetzten Ester des Aethyl- und Amylalkohols mit Essigsäure, Buttersäure und den übrigen höheren Fettsäuren beobachtet worden. Destilliert man Weinhefe, so erhält man nach PELOUZE und LIEBIG (1) Oenanthäther, der nach späteren Untersuchungen hauptsächlich aus
25 Aethylcaprinat besteht und neben Spuren anderer Ester noch Aethylpelargonsäureester zufolge DELFFS (1) und Caprin- und Caprylsäureester zufolge A. FISCHER (1) enthält. Nach LIEBIG geben 40000 Teile Wein einen Teil Oenanthäther, welcher vorwiegend den charakteristischen Weingeruch bedingt.

30 Die **Bouquetstoffe** kann man nach WORTMANN (3) und nach MASTBAUM (1) einteilen in Substanzen, die 1. aus den Rohstoffen stammen, oder 2. bei der Verzuckerung der Maischen und bei der Gärung entstehen, oder 3. sich bei der Lagerung bilden, oder 4. bei der Destillation erzeugt werden. Die Besprechung der ersten Gruppe gehört nicht in
35 den Rahmen dieses Kapitels, obgleich die hierunter fallenden Stoffe eine besondere Wichtigkeit für die Blume des Weines wie auch für den Charakter mancher Biere (Hopfen) besitzen. Die bei der Gärung entstehenden Geruchsstoffe sind die bereits erwähnten Ester der Alkohole und Fettsäuren, welche sämtlich flüchtiger Natur sind. Ein Teil dieser
40 Stoffe, welche die Blume des Weines mitbedingen, ist voraussichtlich chemisch noch ganz unbekannt. Manche Hefen, z. B. die sogen. Fruchtätherhefen LINDNER's (1), erzeugen große Mengen von Ester, vorwiegend Essigäther. Außer diesen flüchtigen Bouquetstoffen, zu denen sich noch der neutrale Bernsteinsäureäthylester von obstartigem Geruche gesellt,
45 kommen im Wein, voraussichtlich auch im Bier, nichtflüchtige Ester vor, welche zufolge K. WINDISCH (5) sehr wesentlich zu dem Geschmacke des Weines beitragen. Es sind dies der saure Bernsteinsäureäthylester und die während der Gärung entstehenden Ester der Weinsäure und der Aepfelsäure, welch letztere beiden Säuren in den Trauben vorge-
50 bildet sind. Zu den primären Bouquetstoffen im Sinne KOSUTÁNY's (2) und WORTMANN's (3), welche die Weinbeeren in die Kelter mitbringen, treten noch von den einzelnen Hefen erzeugte sehr verschiedenartige

Geruchsstoffe hinzu; man vergl. darüber Kosutány (2), Mach und Portele (1), Pichi (1).

Die beim Lagern und Reifen des Weines sich bildenden Bouquetstoffe sollen vorwiegend unter dem Einfluß des Sauerstoffes (s. S. 386) entstehen. Chouard (1) fand, daß sich bei der Hauptgärung Bouquet bildete, welches wieder verschwand, wahrscheinlich durch Reduktionsvorgänge während der Gärung; durch Oxydationsprozesse im Laufe der Lagerung könne das Bouquet wieder auftreten. Nach Wortmann (2) handelt es sich hierbei nicht ausschließlich um einfache chemische Reaktionen sondern um physiologische Vorgänge.

Auch beim Lagern des Bieres vollziehen sich außer der weiter fortschreitenden Gärung Umwandlungen. Nach Nathan (1) handelt es sich hierbei hauptsächlich um die Entfernung von Jungbouquetstoffen, welche dem Biere einen unreifen Geschmack erteilen.

Die Destillate, Cognac und Trinkbranntweine, erleiden während der Lagerung ebenfalls Veränderungen, welche neben anderen Einflüssen (Lagern der Erzeugnisse in nicht gepichten und nicht lackierten Holzfässern, im Gegensatz zum Bier) auch durch Esterifizierung bedingt sind.

Außer diesen eigentlichen Nebenprodukten der Alkoholgärung haben wir noch Stoffe zu betrachten, welche in dem Rohmaterial vorgebildet sind, unter dem Einfluß der Gärung aber zersetzt werden. Es sind dies vorwiegend Glycoside. Durch Enzymspaltung derselben können ihre Komponenten in die gegorene Flüssigkeit gelangen, und so erklärt sich das Vorkommen von Blausäure, Benzoesäure, Benzaldehyd und Benzaldehyd-Cyanhydrin z. B. im Kirschbranntwein zufolge K. Windisch (4), ferner von Methylalkohol in gegorenen Fruchtsäften. Letztere, die aus Pflaumen, Mirabellen, Kirschen und Aepfeln hergestellt waren, ergaben nach Wolff (1) ziemlich regelmäßig ein Proz. des Aethylalkohols an Methylalkohol; bei Weinproben, die mit den Kämmen (Stielen) vergoren waren, enthielt der gewonnene Alkohol etwa 0,15—0,4 Proz. Methylalkohol, während die ohne Kämme vergorenen Traubensäfte höchstens 0,03 Proz. Methylalkohol vom gesamten Alkoholgehalte lieferten. Der durch Vergärung von Zucker durch Weinhefe gewonnene Alkohol war dagegen stets frei von Methylalkohol.

Auch die Stickstoffverbindungen der Hefe (s. Bd. I, S. 241) und des Rohmateriales unterliegen während der Gärung Umwandlungen. So sind in Gärprodukten aufgefunden worden die flüchtigen, und zum Teil auch nicht-flüchtigen Verbindungen: Ammoniak durch Kruis und Rayman (2) und durch K. Windisch (4), Trimethylamin und andere Amine durch Ordonneau (1) und Ludwig (1), Pyridin, Collidin usw. durch Krämer und Pinner (1) und durch Ordonneau (1), β-Glycosin durch Morin (1) und Tanret (1), Abkömmlinge des Pyrazins und andere Basen durch Schrötter (1), Oser (1), Guérin (1), Stöhr (1), E. Bamberger und Einhorn (1), Leucin und Tyrosin.

In den Destillaten gegorener Maischen und Getränke kommen noch mehrere chemische Verbindungen vor, von denen man früher glaubte, daß sie wenigstens zum Teil bei der Alkoholgärung entständen. Hierher gehört zunächst das Furfurol oder Furol, von dem Kruis und Rayman (2) fanden, daß es besonders dann auftritt, wenn sich größere Mengen von Acetaldehyd bildeten. Furol ist bereits im Jahre 1882 von K. Förster (1) im Rohspiritus sowie in den Destillaten von Bier und Wein beobachtet worden. Nach Förster entsteht dieser Körper beim Destillieren durch die Einwirkung der Kochhitze auf die

in den Rohmaterialien enthaltenen Pentosane (s. S. 95 u. 138). Kruis und Rayman halten das Furol für ein Stoffwechselprodukt der Hefen, welcher Anschauung Chapman (1) entgegentrat. Nach Lindet (3) bildet sich aber Furol nur in dem Falle, wenn man solche Würzen vergärt, deren Rohmaterial (die Körnerfrüchte) mit Säuren aufgeschlossen worden sind, oder wenn man die vergorene Maische mit direktem Feuer abtreibt. Verzuckert man die Stärke mit Diastase, und destilliert man mit Dampf, so erhält man kein Furol; letzteres ist demnach kein Gärprodukt. Dieses entsteht vielmehr nach W. Windisch (1) beim Kochen von Kohlenhydraten, zumal den im Pflanzenreiche weit verbreiteten Pentosen, bezw. Pentosanen in saurer Lösung, und demzufolge auch beim Destillieren der stets ja schwach sauren Maischen, Weine und Biere. So ist es zu erklären, daß C. Heim (1) Münchener Biere frei von Furol gefunden hat. Die durch W. Windisch (2) ausgesprochene Vermutung, daß der Pasteurisiergeschmack der Biere mit auf Furol zurückzuführen sei, ist durch Brand (1) und Heim (1) nicht bestätigt worden. Allerdings wird ein furolfreies Bier, nachdem es lange genug gekocht worden ist, sich als furolhaltig erweisen. Das gleiche ist natürlich bei Brennereimaischen und beim Wein der Fall. Die von Lenz (1) angegebene Probe, das Eintreten der Furolreaktion sei entscheidend darüber, ob ein vorgelegtes Cognacmuster reines Weindestillat, also echt sei, ist nicht stichhaltig.

In Gärerzeugnissen sind ferner zufolge K. Windisch (3 u. 4) Terpen und Terpenhydrat, sowie hochsiedende Oele, welche den Rohstoffen entstammen, aufgefunden worden. Unter gewissen Bedingungen können auch Schwefelverbindungen in den Produkten der Gärungsbetriebe vorkommen, so Schwefelwasserstoff im Wein zufolge K. Windisch (5) und schwefelhaltige Ester in Spriten, die aus Melasse und geschwefelten Zuckersäften hergestellt wurden, zufolge Barbet (1) und Elwart (1). Die Bildung dieser Verbindungen läßt sich leicht bei Gegenwart freien Schwefels oder schwefliger Säure durch die Wirkung reduzierender Hefenenzyme (s. d. 20. Kap.) erklären.

§ 89. Die unmittelbar vergärbaren Zuckerarten.

Wie schon auf S. 372 bemerkt worden ist, kann der Rohrzucker nur nach Aufnahme eines Moleküles Wasser gären, indem er bei diesem Vorgang durch das Enzym Invertase (s. § 91) in zwei Hexosen, nämlich Glucose und Fructose, übergeführt wird, gemäß der Gleichung

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 2\, C_6H_{12}O_6.$$

Lange Zeit stand diese Beobachtung vereinzelt da; alle Versuche, die Maltose, welcher die gleiche empirische Zusammensetzung wie dem Rohrzucker zukommt, durch eine ähnliche enzymatische Spaltung in zwei Hexosen zu zerlegen, mißlangen, so daß man annahm, Maltose werde direkt vergoren; vergl. Morris (1), Hansen (1), Dastre (1), Dünnenberger (1), Mehring (1) und Donath (2). E. Fischer (1) bewies aber einwandfrei, daß die Maltose vor ihrer Vergärung durch ein besonderes Enzym, die Maltase (s. § 92), in zwei Moleküle Glucose gespalten wird. Und als es ihm (2) in Gemeinschaft mit P. Lindner zu konstatieren gelang, daß der Rohrzucker auch durch *Monilia candida* (s. S. 336), die allerdings nicht die gewöhnliche Hefeninvertase enthält, hydrolysiert wird, welcher Feststellung sich dann noch andere Beispiele anschlossen,

war der Satz zur Tatsache erhoben, daß alle Di- und Polysaccharide, um der Alkoholgärung durch Hefen fähig zu werden, durch besondere (im folgenden Kapitel zu besprechende) Enzyme der Hefe zuvor in einfachere Zuckerarten gespalten werden müssen. In diesem Umstand ist der Unterschied zwischen den unmittelbar gärfähigen Zuckerarten und den Di- und Polysacchariden begründet. Die ersteren sind Verbindungen, deren Kohlenstoffatome in gerader Kette miteinander zusammenhängen, während die letzteren ätherartige Körper darstellen, in denen einzelne Kohlenstoffketten durch ein oder sogar mehrere Sauerstoffatome miteinander verbunden sind. Wer sich eingehender mit dem Studium der Zuckergruppe beschäftigen will, dem seien die Werke von TOLLENS (1) und E. O. VON LIPPMANN (1) empfohlen.

Bezüglich der vergärbaren Zuckerarten (auch der zusammengesetzten) fand E. FISCHER (3) den Satz auf: Nur diejenigen sind der wahren Alkoholgärung (durch Hefen) fähig, deren im Atomkomplex vorhandene Anzahl von Kohlenstoffatomen durch die Zahl Drei teilbar ist.

Die ersten Glieder dieser Gruppe würden die Triosen ($C_3H_6O_3$) sein, welche nicht in der Natur vorkommen, sondern künstlich dargestellt worden sind und in der Synthese der Zuckerarten eine wichtige Rolle spielen. Die Aldotriose oder i-Glycerose soll nach E. FISCHER (4) der Alkoholgärung fähig sein. WOHL (1) und EMMERLING (1) bestreiten dies aber. Dieser Zucker kondensiert sich nämlich leicht zu einer Verbindung von der Formel $C_6H_{12}O_6$, und letzterer Zucker ist es, welcher im Glycerosesirup die Gärungserscheinungen bedingt. Das gleiche gilt von der Ketotriose, dem Dioxy-Aceton, deren Konstitutionsformel $OH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot CH_2 \cdot OH$ ist, und welche BERTRAND (1) aus Glycerin durch Gärung mittelst des *Bact. xylinum* erhielt. Sie ist nach EMMERLING (2) unvergärbar; erst nach längerem Erwärmen treten schwache Gärungserscheinungen auf, die durch eine Kondensation der Triose zu einer Hexose ihre Erklärung finden.

Wir schließen hier gleich die Besprechung der ebenfalls nur künstlich dargestellten d-Manno-Nonose an, einer Zuckerart von der Formel $C_9H_{18}O_9$, welche nach E. FISCHER (7) leicht und vollständig vergärt. Es muß hier auch der α-Glyco-Heptose gedacht werden, von welcher LINDNER (1) fand, daß sie mit einer Hefe (*Nr. 691* der Sammlung des Institutes für Gärungsgewerbe zu Berlin) aus dem Schleimfluß einer Eiche gärfähig ist. Da dieser künstlich dargestellte Zucker 7 Atome Kohlenstoff gemäß der Formel $CH_2OH \cdot (CHOH)_5 \cdot COH$ enthält, erscheint eine Nachprüfung dieser Angabe dringend nötig, da im zutreffenden Falle der FISCHER'sche Satz von der Dreizahl der Kohlenstoff-Atome gärfähiger Zuckerarten seine Gültigkeit einbüßen würde.

Früher glaubte man auch, daß die Pentosen, Zucker von der Formel $C_5H_{10}O_5$, zu denen Xylose und Arabinose, sowie Rhamnose, eine Methylpentose $C_6H_{14}O_6$, gehören, der wahren Alkoholgärung durch Hefen unterliegen. Ein lebhafter Meinungsstreit bestand darüber, dessen lange Dauer durch zwei Umstände ermöglicht wurde, erstens, daß durch Verwendung unreiner Hefenaussaaten Mischgärungen entstanden, und zweitens, daß bei Verwendung wirklich reiner Hefe der Umstand außer acht gelassen wurde, daß Hefe auch solche Zuckerarten assimiliert und zum Aufbau neuer Zellen verwertet, welche sie nicht vergären kann. Ein bekanntes Beispiel dafür bietet der Milchzucker. Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß bei großer Hefenaussaat und geringer Zuckermenge der vorhandene Zucker vollständig oder zum Teil ver-

schwindet, ohne daß eine wahre Gärung statthätte. Bei der Anwendung unreiner Hefe oder nicht-sterilisierter Nährlösungen können selbstverständlich Bakterien mitwirken; wir werden deren im § 90 eine Anzahl kennen lernen, welche aus Pentosen Alkohol erzeugen. Den Nachweis, daß Pentosen nicht der Alkoholgärung durch Hefen fähig sind, erbrachten zahlreiche Forscher, so Tollens und Glaubitz (1), Scheibler, Cross und Bevan (1), Stone und Tollens (1), dann Smith (1), O. E. von Lippmann (2), E. Fischer (5), wie auch P. Lindner (2). Hefenpreßsaft ist nach Buchner und Rapp (1) ebenfalls wirkungslos auf die Pentosen.

Die eigentlichen, unmittelbar gärfähigen Zuckerarten sind die **Hexosen,** Verbindungen von der allgemeinen Formel $C_6H_{12}O_6$, und zwar von ihnen nur jene, welche bezüglich ihrer Konfiguration der d-Reihe angehören, während die l-Verbindungen unvergärbar sind. Auch hier unterscheiden wir, wie bei den bisher genannten Zuckerarten, Aldosen und Ketosen.

Der am weitesten verbreitete und am besten bekannte Zucker der Aldohexosen ist die d-Glucose, welche auch Dextrose, Traubenzucker, Stärkezucker, Krümelzucker und Harnzucker genannt wird. Sie wird von allen Organismen vergoren, welche überhaupt Alkoholgärung erregen, so von sämtlichen Kulturhefen, von denen nach Lange (1) bisher etwa 700 Rassen untersucht worden sind, sowie von allen Weinhefen. Man vergl. auch S. 173 u. f. und S. 292.

Die d-Mannose, auch Isomannitose, Seminose und Carubinose genannt, kommt im freien Zustande in der Natur nur vereinzelt vor, so nach Tsukamato (1) in dem japanischen *Amorphophallus Konjaku*, nach Prinsen-Geerligs (1), Pellet (1) u. a. in manchen Kolonialmelassen, in den Schalen der Orange und nach Grüss (3) transitorisch in keimenden Datteln. Dagegen bildet sie einen regelmäßigen Bestandteil der im Pflanzenreiche weit verbreiteten Mannane (s. Bd. I, S. 228), welche gewissermaßen Kondensationsprodukte der Mannose für sich oder mit anderen Zuckerarten darstellen. In letzterem Falle spricht man von gepaarten Mannanen. Die d-Mannose wird von allen den Hefen Lindner's (2) vergoren, welche auch die d-Glucose in Gärung versetzen, mit Ausnahme von *Saccharomyces membranaefaciens*, *S. farinosus*, *S. Bailii*, einem *S. apiculatus* aus Leipziger Met und einem aus Himbeersaft, *S. exiguus*, *Endoblastoderma amycoides I*, *E. liquefaciens*, einer Kahmhefe aus Eibischsaft, einer Fruchtätherhefe aus Gallengärung und *Schizosaccharomyces Pombe*.

Daß die d-Galactose, welche in der älteren Literatur auch Lactose (nicht zu verwechseln mit dem Disaccharid Lactose, Milchzucker, der heutigen Terminologie) und Lactoglycose genannt worden war, im freien Zustand in der Natur vorkommt, ist nicht mit Sicherheit erwiesen. In Verbindung mit d-Glucose bildet sie den Milchzucker und die Melibiose. Im Pflanzenreiche ist d-Galactose ein Bestandteil mancher Glycoside, besonders aber der weit verbreiteten Galactane (s. Bd. I, S. 228 u. 234), welche wir in eigentliche und gepaarte Galactane einteilen können. Eigentliche Galactane sind in der Gerste, wie im Malze und in zahlreichen Samen, auch in den Produkten und Abfällen der Rohr- und Rübenzuckerindustrie zufolge Prinsen-Geerligs (1) und E. O. von Lippmann (2) vorhanden. Die Gelose, der Hauptbestandteil des Agar-Agar, besteht nach Payen (1) und Bauer (1) vorwiegend aus Galactan. Gepaarte Galactane kommen in den Pflanzenschleimen vor, im Hefengummi zufolge Schützenberger (2), als Galactoarabane in verschiedenen Samen nach E. Schulze (3). Galactoxylan bildet zu-

folge LINTNER (1) einen Bestandteil von Weizen, Gerste und Malz. Im arabischen Gummi sind je nach der Herkunft verschiedene gepaarte Galactane enthalten. Auch im Tierreiche treffen wir auf diese Körper, welche nach BÉCHAMP (3) neben Milchzucker in der Milch vorkommen und zufolge THUDICHUM (1) einen Bestandteil des Protagons bilden. 5 Die d-Galactose wird nach LINDNER (1) von allen Hefen vergoren, welche auch d-Glucose spalten, mit Ausnahme von folgenden Arten: *Sacch. membranaefaciens, S. farinosus, S. Bailii, S. apiculatus, Schizos. Pombe, Schizos. mellacei*, sowie einigen Hefen aus Gallengärung und aus Gurkenlake. Dagegen wird sie auffallenderweise von zwei hautbildenden 10 Sproßpilzen (*Nr. 127* u. *Nr. 374* der Berliner Sammlung) vergoren, welche Glucose, Mannose und Fructose intakt lassen. Eine Nachprüfung dieser Angabe wäre dringend zu befürworten, zumal über keine Zuckerart die älteren Angaben über die Vergärbarkeit so widerspruchsvoll lauten, wie gerade über die d-Galactose. Es würde zu weit führen, alle Mitteilungen 15 über diesen Gegenstand im einzelnen anzuführen; es sei daher auf die Arbeit von BAU (2) verwiesen, in welcher die ältere Literatur kritisch gesichtet ist. Nach E. FISCHER wird Galactose von den Kulturhefen, von *S. Pastorianus I, II, III, S. ellipsoideus I* u. *II, S. Marxianus*, sowie von Milchzuckerhefe vergoren, während *S. membranaefaciens* und *S.* 20 *productivus* keine Gärung erregen. Nach KOZAI (1) vergärt die Saké-Hefe ebenfalls Galactose.

Während die bisher genannten drei Zuckerarten der Hexosengruppe zu den Aldosen gehören, haben wir als Repräsentanten der Ketohexosen die d-Fructose, Lävulose oder Fruchtzucker, anzuschließen, welche 25 im Pflanzenreiche weit verbreitet ist, die d-Glucose fast stets begleitet und daher das gleiche Vorkommen wie die letztere hat. Gemenge gleicher Teile der beiden Zuckerarten heißen Invertzucker, doch bezeichnet man mit diesem Namen auch überhaupt Gemische von wechselnder Zusammensetzung der genannten Zucker. Der Fruchtzucker 30 bildet einen Bestandteil mehrerer Polysaccharide, so des Rohrzuckers, der Melitriose, der Lupeose, Stachyose usw., des Inulins und verwandter Stoffe, sowie des Hefenlävulans (s. Bd. I, S. 232). Sie wird von allen Organismen vergoren, welche die d-Glucose vergären, mit einziger Ausnahme einer Kahmhefe (*Nr. 178*) LINDNER's (1). 35

Von Hexosen sind nur die bisher genannten vier (d-Glucose, d-Mannose, d-Galactose, d-Fructose) durch Hefen vergärbar. Alle übrigen sind unvergärbar.

§ 90. Anhang: Alkoholbildung durch Bakterien.

Während bei der Gärung mittelst Hefen etwa 95 Proz. des Zuckers 40 in Alkohol und Kohlensäure umgesetzt werden, verläuft die Alkoholbildung durch Bakterien wesentlich anders. Hier treten zahlreiche Nebenprodukte auf, ja, man kann sagen, daß die Erzeugung von Alkohol selbst nur ein neben anderen physiologischen Prozessen herlaufender Vorgang ist. 45

FRIEDLÄNDER's Pneumonie-Kokkus studierten BRIEGER (2), sowie FRANKLAND (1) in Gemeinschaft mit seinen Mitarbeitern STANLEY und FREW eingehend. Bei der Gärung entstehen aus Rohrzucker, wie auch aus Glucose, milchsaurem Kalk oder Kreatinin, neben Aethylalkohol Essigsäure, Ameisensäure und Bernsteinsäure, und zwar bildeten sich aus 60 g 50

in 3-proz. Lösung 0,5897 g Aethylalkohol. Mannit ($C_6H_{14}O_6$) wird von diesem Kokkus leichter als Glucose angegriffen: aus 60 g dieses sechswertigen Alkohols erhielten die genannten Forscher 4,06—5,06 g Aethylalkohol. Daneben entstehen Kohlensäure und Wasserstoff. Nach GRIMBERT (1) 5 vergärt dieser Spaltpilz Arabinose nicht, dagegen greift er Xylose an und erzeugt aus dieser 6,93 Proz. Aethylalkohol neben 23,4 Proz. Essigsäure, 19,86 Proz. Bernsteinsäure und geringen Mengen von Milchsäure. Auch die dem Pneumoniekokkus ähnlichen Bakterien, welche GRIMBERT mit den Buchstaben *F, B, G, H, I* bezeichnet, vergären sowohl Lactose 10 wie Glycerin und erzeugen aus dem Milchzucker 8,86—12,43, aus dem Glycerin 6—19,40 Proz. Alkohol, daneben in wechselnden Mengen Essigsäure, Bernsteinsäure und Milchsäure, und zwar so, daß aus Milchzucker keine Milchsäure, aus Glycerin aber keine Bernsteinsäure entsteht.

Der Bazillus des malignen Oedems (s. Bd. II, S. 113) erzeugt nach 15 KERRY und FRAENKEL (1) aus Glucose Aethylalkohol neben Buttersäure und Milchsäure, aus Milchzucker, Rohrzucker und löslicher Stärke in langsamer Gärung Aethylalkohol neben Ameisensäure, Buttersäure und Milchsäure, aus milchsaurem Kalk dagegen neben den genannten Säuren auch Propylalkohol.

20 Eingehender wurde der *Bacillus ethaceticus* (s. Bd. II, S. 127) studiert. Er liefert nach FRANKLAND (1 u. 2) und seinen Mitarbeitern aus 60 g Mannit bis 11,145 g Aethylalkohol, vergärt ferner Glycerin zu Aethylalkohol, Essigsäure, Bernsteinsäure und Ameisensäure und lieferte aus 60 g d-Glucose 5,794—7,047 g Alkohol. Auch soll dieser Spaltpilz 25 Arabinose zu Aethylalkohol vergären: aus 10 g Arabinose wurden 1,129 bis 1,235 g Alkohol gewonnen, neben Essigsäure, Bernsteinsäure, Ameisensäure, Kohlensäure und Wasserstoff. Die Gärungsgleichung für Mannit läßt sich nach FRANKLAND und LUMSDEN wie folgt ausdrücken:

$$\underset{\text{Mannit}}{3C_6H_{14}O_6} + H_2O = \underset{\text{Essigsäure}}{CH_3 \cdot COOH} + \underset{\text{Aethylalkohol}}{5C_2H_6O} + \underset{\text{Ameisensäure}}{5H \cdot COOH} + \underset{\text{Kohlensäure}}{CO_2},$$

30 während der zuvor erwähnte Pneumokokkus den Mannit nach der Gleichung spaltet:

$$6C_6H_{14}O_6 + H_2O = 4CH_3 \cdot COOH + 9C_2H_6O + 10CO_2 + 8H_2.$$

Die Zersetzung desselben Kohlenhydrates erfolgt durch zwei Bakterien häufig in ganz verschiedener Weise: besonders das Auftreten von 35 Kohlensäure und Wasserstoff ist bei wechselnden Bedingungen ein unregelmäßiges. Man kann für diese Erscheinung nach FRANKLAND und MAC GREGOR die Erklärung zulassen, daß diese beiden Gase überhaupt nicht primär entstehen, sondern ihren Ursprung einer sekundären Zersetzung der zuerst gebildeten Ameisensäure verdanken.

40 Ein Bazillus, der aus einer in Zersetzung geratenen Eisenammoniumcitratlösung abgeschieden und demnach als *Bac. ethacetosuccinicus* bezeichnet wurde, erzeugt nach FRANKLAND (3) sowie nach FREW aus Dulcit 25,6 und aus Mannit 23,3 Proz. Alkohol, neben Bernsteinsäure, Essigsäure und Ameisensäure. Die NENCKI'schen Dünndarmbakterien 45 untersuchte FREY (1); *Bact. aerogenes lactis* und *Bact. ilei* vergären Glucose zu Aethylalkohol, Essigsäure, Bernsteinsäure, Rechts- und Linksmilchsäure, daneben bilden sich größere Mengen von Kohlensäure und Wasserstoff.

Nach BOVET (1) entstehen durch einen dem Erreger der Cholera 50 ähnlichen Bazillus aus Glucose Aethylalkohol, sowie Bernsteinsäure und Milchsäure.

Der *Bacillus suaveolens* verwandelt Stärke in Dextrin und Glucose,

und diese, wie SCLAVO und GOSIO (1) fanden, weiter in Alkohol, Aldehyd, Ameisensäure, Essigsäure und Buttersäure.

SCHARDINGER's (1) schleimbildender Wasserbazillus (s. Bd. II, S. 200) erzeugt aus Zucker Alkohol, viel Wasserstoff, Milchsäure und Bernsteinsäure. 5

Ein eigentümliches Verhalten soll der sogen. Mannitbazillus zeigen. GAYON und DUBOURG (1) haben nachgewiesen, daß er aus allen Zuckerarten, mit Ausnahme von d-Fructose, neben Glycerin, Kohlensäure, Bernsteinsäure, Milchsäure und Essigsäure auch Alkohol bildet, die d-Fructose dagegen in Mannit verwandelt. Wahrscheinlich spielt hier die Kon- 10 stitution der Zuckerarten eine Rolle, denn die d-Fructose ist eine Ketose, während die übrigen vergärbaren Zuckerarten zu den Aldosen gehören.

Eine dem *Bact. coli* ähnliche Art bildet nach GRIMBERT (2) aus Lactose Aethylalkohol, sowie auch in erheblichen Mengen Essigsäure und Bernsteinsäure, nebst Spuren von Milchsäure. 15

Viele Milchsäurebakterien und Buttersäurebakterien erzeugen als Nebenprodukt ebenfalls Alkohol. So gibt ein Milchsäurebazillus, welchen KRUIS und RAYMAN (3) aus gesäuertem Hefengut (s. Bd. V, S. 295) abgeschieden haben, in Bierwürze Aethylalkohol neben Ameisensäure, Essigsäure und Milchsäure. Ueber andere alkoholbildende Milchsäure- und 20 Buttersäure-Bakterien vergl. man das 3. und 7. Kapitel des Zweiten Bandes und § 55 des Fünften Bandes.

Während die Hefen nur solche Kohlenhydrate vergären, deren im Molekül vorhandene Anzahl von Kohlenstoffatomen ein Vielfaches der Zahl Drei ist (s. S. 397), sind die Bakterien nicht so wählerisch. Der 25 *Bacillus ethaceticus* bildet aus Arabinose ($C_5H_{10}O_5$) 11—12 Proz., der Pneumoniebazillus aus Xylose rund 7 Proz. Alkohol. Nach TOLLENS (3) erzeugt ein durch LEICHMANN reingezüchteter Bazillus aus Arabinose Alkohol neben Essigsäure und Milchsäure. E. SALKOWSKI (2) ließ Fäulnisbakterien auf die Pentosen einwirken; aus l-Xylose wurde Alkohol 30 nicht erhalten, dagegen ergab das Gemisch der nicht näher identifizierten Mikroorganismen in zwei von fünf untersuchten Fällen aus l-Arabinose bis zu 40 Proz. Alkohol. Aus l-Xylose entsteht hinwieder durch den Mannitbazillus von GAYON und DUPETIT (1) Alkohol.

Außer Aethylalkohol, den wir als den bekanntesten Repräsentanten 35 der Klasse der Alkohole zuerst erwähnten, entstehen auch andere Alkohole durch Bakterientätigkeit.

Methylalkohol wird nach EMMERLING (3) durch den *Bacillus boocopricus*, der sich im Kuhkot findet, aus Glycerin in Gegenwart von kohlensaurem Kalk neben Ameisensäure, Buttersäure und Bernsteinsäure 40 erzeugt.

Des Auftretens von Butylalkohol haben wir bei der Besprechung der Nebenprodukte der Alkoholgärung (s. S. 390) bereits gedacht. Bakterien, welche besonders viel von diesem Alkohol erzeugen, sind der *Bac. butyricus* BOTKIN's (1), welcher aus Milch isoliert wurde (s. Bd. II, S. 111 u. 45 122), und der durch EMMERLING (4) aus elsässischem Heu abgeschiedene *Bac. butylicus*. Letzterer vergärt Glycerin in der Weise, daß 6.3 Proz. normaler Butylalkohol entstehen, aus Mannit wurden 10.5 Proz. desselben Alkohols gewonnen, dagegen entstand bei Vergärung einer Traubenzuckerlösung mit demselben Bazillus nur Aethylalkohol. 50

Aus Erde erhielt GRIMBERT (3) den anaeroben *Bac. orthobutylicus*, welcher Mannit, Arabinose, Glucose, Invertzucker, Galactose, Rohrzucker, Maltose, Milchzucker, Dextrin, Stärke und Inulin vergärt, und zwar die

drei Disaccharide, wie auch Inulin ohne vorhergehende Inversion, nicht aber Trehalose und Erythrit. Es entstehen dabei normaler Butyl- und etwas Isobutylalkohol, Buttersäure und Essigsäure, zuweilen auch Ameisensäure, ferner Kohlensäure und Wasserstoff. Um ein Beispiel anzuführen, sei erwähnt, daß 2,4 g Glucose 0.264 g Butylalkohol bildeten. GRIMBERT gibt für diese Gärung die nachstehende Zersetzungsgleichung:

$$\underset{\text{Glucose}}{7C_6H_{12}O_6} = \underset{\text{Butylalkohol}}{2C_4H_{10}O} + \underset{\text{Essigsäure}}{2C_2H_4O_2} + \underset{\text{Buttersäure}}{5C_4H_8O_2} + 10CO_2 + 2H_2 + 6H_2O.$$

Diese Gleichung ist aber nicht für alle Fälle maßgebend; denn das Mengenverhältnis der gebildeten Gärprodukte ändert sich besonders mit der Reaktion der Flüssigkeit. Wird letztere sauer, so vermehrt sich der Gehalt an Butylalkohol auf Kosten der Buttersäure, während diese sich in dem Gärungsgemisch anreichert, sobald man kohlensauren Kalk hinzufügt und somit die Säure abstumpft. Es scheinen also bei saurer Reaktion Umstände einzutreten, unter denen die primär gebildete Buttersäure zum Alkohol reduziert wird, ein Vorgang, den BAU (1) als Hypothese für die Bildung der Fuselöle (vergl. S. 393) annimmt. GRIMBERT fand, daß dem Maximum der Bildung von Butylalkohol ein Minimum der Buttersäureerzeugung entspricht; werden die Bakterienzellen durch Säure oder in anderer Weise in der freien Entwicklung gehemmt, so entsteht mehr Alkohol. Die Kraft des Aussaatmateriales hinsichtlich der Butylalkoholbildung wächst während der ersten Tage und läßt später nach. Aus Glucose entsteht viel Butylalkohol, aus Inulin, welches Fructose-Gruppen enthält, dagegen wenig. Fructose wird langsamer vergoren als Glucose. Glycerin unterliegt ebenfalls der Gärung, doch bildet sich bei dieser auch viel Milchsäure.

Sehr eingehende Studien verdanken wir BEIJERINCK (1) über die Butylbakterien; vergl. Bd. II, S. 112 und Bd. V, S. 262. Durch eine spontane Gärung läßt sich leicht die Gegenwart der Butylbakterien nachweisen, wenn man in 50—100 ccm kochendes Wasser, das sich in einem schmalen Becherglase befindet, nach und nach so viel grobgemahlenes nicht gesiebtes frisches Mehl aus nackter Gerste gibt, bis das ganze dickbreiig wird. Die letzten Anteile des Mehles dürfen dabei nur wenige Sekunden der Temperatur von 100° ausgesetzt werden. Nachdem man die Maische sofort in den Thermostaten bei 35—37° hingestellt hat, bemerkt man nach 12 Stunden einige Gasblasen in derselben und nach 36 Stunden deutlich den Geruch von Butylalkohol. Die *Granulobacter*-Arten besitzen ein starkes Reduktionsvermögen; so verwandeln sie u. a. Indigblau in Indigweiß. Es wäre zu untersuchen, ob ihnen auch die Fähigkeit eigen ist, Buttersäure und andere höhere Fettsäuren zu den entsprechenden Alkoholen zu reduzieren.

Ein ganz besonderes Interesse erregen die Amylalkohol bildenden Bakterien. Wir haben sie bereits auf S. 391 bei der Besprechung der Nebenprodukte der Alkoholgärung kennen gelernt. Der durch PERDRIX (1) untersuchte *Bac. amylozyma* (s. Bd. II, S. 111 u. 121) bildet unter Umständen auch Amylalkohol, und zwar liefert er aus 100 g Kartoffeln 2.3—2.5 ccm eines Alkoholgemisches, in welchem sich 25—28 Proz. Amylalkohol vorfinden. Es werden ca. 11 Proz. der Kartoffelstärke in die Alkohole umgewandelt. Werden also 100 kg Stärke, selbstverständlich nach dem Maischen, durch diesen Bazillus zersetzt, so würden wir theoretisch 7.88 Literprozent, praktisch vielleicht 6.6 Literprozent Alkohol erhalten, wovon etwa 2—1.65 Literprozent Amylalkohol wären. Diese Menge ist aber so gering, daß aus der Tätigkeit dieses Bazillus

allein die Bildung der Fuselöle in den industriellen Gärungen nicht erklärt werden kann. Aehnliche Verhältnisse walten bei dem Bazillus ob. den PÉREIRE und GUIGNARD (1) auffanden. Er vergärt alle Zuckerarten und Stärke; unter den Gärprodukten finden sich Aethyl- und Amylalkohol, Essigsäure und Buttersäure, Kohlensäure und Wasserstoff. 5 Zur Darstellung von amylalkoholhaltigem Sprit, der als Denaturierungsmittel verwendet werden soll, schlagen PÉREIRE und GUIGNARD folgendes Verfahren vor. Man setzt einer Brennereimaische kohlensauren Kalk im Ueberschusse zu, bringt sie in einem geschlossenen, mit Abzugsrohr für die entbundenen Gase versehenen Behälter auf eine Temperatur von 10 40^0 und fügt eine Reinkultur jenes Bazillus hinzu. Während der Bakteriengärung ist die Temperatur von 40^0 inne zu halten. Sobald jene beendigt ist, kühlt man die Maische, welche noch einen Teil des Zuckers enthält, auf etwa 24^0 ab und führt die Vergärung durch eine gewöhnliche Brennereihefe zu Ende. Die vergorene Maische wird nun 15 in der in der Brennereipraxis geübten Weise abgetrieben, es destilliert zunächst Alkohol, sodann ölartige Körper (Amylalkohol) über. Man kann nach den genannten Forschern die Arbeitsweise in der Vergärung auch umkehren, also zunächst die Maische durch Hefe vergären und sie dann der Einwirkung der Bakterien überlassen, ohne daß an 20 dem Endresultat etwas geändert wird. Die gemischten Destillate sollen einen Sprit von 90 Vol.-Proz. mit hohem Gehalt an Amylalkohol ergeben, der bei der Verbrennung eine hohe Leuchtkraft entwickelt und als Ersatz des Petroleums dienen kann. Bei der Wichtigkeit, welche die Frage der Bildung der Fuselöle bei der Gärung besitzt, — eine 25 Frage, die, wie wir auf S. 394 bemerkt haben, trotz zahlreicher umfassender Arbeiten noch keineswegs gelöst ist, — sind die Studien von PERDRIX sowie von PÉREIRE und GUIGNARD wohl zu beachten, indessen sind sie bis jetzt noch zu wenig ausgebaut, um über die Entstehung des Amylalkohols ein abschließendes Urteil ziehen zu können. 30

Eine technische Verwendung der Bakterien zur Erzeugung von Aethylalkohol ist vollständig ausgeschlossen, da diese dem Wettbewerb mit den Saccharomyceten nicht Stand halten können; jedoch erscheint es möglich, Bakterien zur Gewinnung höherer Alkohole in den Dienst der Industrie zu stellen. Die Frage, ob sie die höheren 35 Alkohole aus dem Zucker und den Abbauprodukten der Stärke oder aber zum Teil aus anderen Stoffen des Rohmateriales (der Maischen etc.) bilden, ist noch nicht entschieden. Immer aber entstehen neben jenen noch viele Nebenerzeugnisse. Die von mehreren Forschern angegebenen Zersetzungsgleichungen, aus deren Zahl zuvor ein paar Beispiele wieder- 40 gegeben wurden, sind für einen besonderen Versuch wohl zutreffend, in welchem das vergorene Zuckermaterial und die gewonnenen Gärprodukte genau bestimmt wurden. Eine gewisse Aehnlichkeit besitzen diese Gleichungen mit jener von PASTEUR betreffs der Bildung von Glycerin und Bernsteinsäure aus dem Zucker (s. S. 378), eine Formel, welche die 45 genauere und wissenschaftliche Erforschung dieses Gebietes nicht befriedigte. In noch höherem Grade ist dies bei den Bakteriengärungen der Fall.

Weitere Angaben über Alkoholbildung durch Bakterien findet man an anderen Stellen der fünf Bände dieses Handbuches, die in den 50 Registern unter den Schlagworten Alkohol, Alkoholbildung, Alkoholgärung wie auch unter den Namen der einzelnen Zuckerarten und Alkohole verzeichnet sind.

Literatur

zum Kapitel Chemismus der Alkoholgärung.

*Ahrens, Felix B., (1) Zeitschr. f. angew. Chemie, 1900, S. 483. *Amthor, Karl, (1) Z. f. physiolog. Chem., 1888, Bd. 12, S. 64. — (2) Chem.-Ztg., 1891, Bd. 15, S. 670. *Baeyer, Adolf, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1870, Bd. 3, S. 63. *Balard, (1) Ann. de chim. et de phys., 1844, 3. sér., Bd. 12, S. 294. *Bamberger, Eugen, und Einhorn, Alfr., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1897, Bd. 30, S. 224. *Barbet, (1) Bull. de l'assoc. des Chimistes, 1900, Bd. 19, S. 1107. *Bau, Arminius, (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1904, Bd. 27, S. 317. — (2) Ebenda, 1896, Bd. 19, S. 303. *Bauer, (1) J. f. prakt. Chem., 1884, Bd. 30, S. 283. *Béchamp, A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1872, Bd. 75, S. 1036. — (2) Ebenda, 1863, Bd. 56, S. 969 u. 1184. — (3) Chem.-Ztg., 1891, Bd. 15, S. 1126. *Beijerinck, M. W., (1) Verhand. der k. Akad. v. Wetenschappen te Amsterdam, 2. sectie, Deel I, 1893; Deel II, 1894, Nr. 40, und Récueil des travaux chim. des Pays-Bas, 1893, Bd. 12, S. 141. — (2) Bulletin de l'assoc. Belge des chimistes, 1890, Bd. 16, S. 178, und Archives néerlandaises des Sc. exactes et nat., 1890, Bd. 23, S. 428. — (3) Centralbl. f. Bakt., 1892, Bd. 11, S. 68. — (4) Ebenda, 2. Abt., 1897, Bd. 3, S. 449. *Beissenhirtz, (1) Berliner Jahresberichte, 1818, S. 158. *Bernheimer, Oskar, (1) Allgem. Weinzeitg., 1895; ref. in Chem. Centralbl., 1895, Bd. II, S. 650. *Berthelot, Marcelin, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1863, Bd. 57, S. 797. *Bertrand, Gabriel, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1898, Bd. 126, S. 842 u. 984. *Biourge, (1) La Cellule, 1895, Bd. 11, S. 95. *Blumenthal, (1) Virchows Archiv, 1894, Bd. 137, S. 539. *Borgmann, (1) Zeitschr. f. analyt. Chem., 1886, Bd. 25, S. 532. *Bornträger, (1) Zeitschr. f. angew. Chem., 1894, S. 13. — (2) Deutsche Chemiker-Ztg., 1893, Bd. 7, S. 377. *Botkin, S., (1) Z. f. Hyg., 1892, Bd. 11, S. 421. *Bouchardat, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1874, Bd. 78, S. 1145. *Bourquelot und Hérissey, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1899, Bd. 129, S. 228. *Boussingault, (1) Ann. de chim. et de phys., 1881, 5. sér., Bd. 22, S. 118. *Bovet, V., (1) Ann. de microgr., 1891, Bd. 3, S. 353. *Brand, Josef, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1898, Bd. 21, S. 255. *Brefeld, Oskar, (1) Landw. Jahrbücher, 1876, Bd. 59, S. 310. *Brieger, Ludwig, (1) J. f. prakt. Chem., 1878, Bd. 17, S. 124. — (2) Z. f. physiolog. Chem., 1883, Bd. 8, S. 306. *Brown, Adrian J., (1) Journ. Chemical Soc., Transactions, 1892, Bd. 61, S. 369. — (2) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1897, Bd. 3, S. 33. *Buchner und Hahn, (1) Die Zymasegärung. Berlin 1903, S. 210. *Buchner und Meisenheimer, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1904, Bd. 37, S. 417. — (2) Ebenda, 1905, Bd. 38, S. 620. *Buchner und Rapp, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1898, Bd. 31, S. 1085. — (2) Ebenda, 1901, Bd. 34, S. 1527. — (3) Ebenda, 1898, Bd. 31, S. 2671. — (4) Ebenda, 1897, Bd. 30, S. 2668. *Butlerow, (1) Liebigs Ann., 1868, Bd. 145, S. 277. *Cahours, (1) Ann. de chim. et de phys., 1839, Bd. 70, S. 81. *Cahours und Demarçay, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1875, Bd. 80, S. 1568. *Chancel, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1853, Bd. 38, S. 410. *Chapman, C., (1) J. federated Inst. Brewing, 1897, Bd. 3, S. 240. *Chouard, (1) Chronique agricole du Canton de Vaud, 1892, 25. Juni. *Chudiakow, N. von, (1) Landw. Jahrbücher, 1894, Bd. 23, S. 391. *Cross, C. F., und Bevan, E. J., (1) J. federated Inst. Brewing, 1897, Bd. 3, S. 2. *Cross, C. F., Bevan, E. J., und Smith, Claud, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1895, Bd. 28, S. 2604. *Dastre, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1883, Bd. 96, S. 932. *Delbrück, Max (1) W. f. Brauerei, 1902, Bd. 19, S. 25. — (2) Ebenda, 1903, Bd. 20, S. 66. *Delffs, (1) Poggendorffs Ann., 1851, Bd. 84, S. 505. *Donath, Ed., (1) Z. f. Naturwissenschaften, 1894, Bd. 67, S. 179. — (2) Chem.-Ztg., 1891, Bd. 15, S. 597. *Dossios, (1) Jahresber. Chemie, 1866, S. 384. *Dubrunfaut, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1856, Bd. 42, S. 945. — (2) Ebenda, 1846, Bd. 23, S. 38; 1856, Bd. 42, S. 902. *Duclaux, Emil, (1) Ann. Pasteur, 1897, Bd. 11, S. 348. — (2) Ebenda, 1893, Bd. 7, S. 751. — (3) Ebenda, 1892, Bd. 6, S. 593. — (4) Thèse. Paris 1865. — (5) Comptes rend. de l'Ac., 1874, Bd. 78, S. 1160. — (6) Ann. Pasteur, 1896, Bd. 10, S. 119. *Düll, (1) Chem.-Ztg., 1895, Bd. 19, S. 216. *Dünnenberger, Karl, (1) Bot. Centralbl., 1888, Bd. 33, S. 245. *Dumas und Boullay, (1) Ann. de chim. et de phys., 1828, 2. sér., Bd. 37, S. 45. *Durin, (1) Bull. de l'assoc. des Chimistes, 1887, Bd. 6, S. 239. — (2) Ebenda, 1890, Bd. 8, S. 296. *Eck, (1) Neue Zeitschr. f. deutsche Spiritusfabrikanten, 1877, Bd. 11, S. 149. *Effront, Jean, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1894, Bd. 119, S. 92. — (2) Ebenda, S. 169. — (3) Ebenda, 1897, Bd. 125, S. 38 u. 116. — (4) Bull. de l'Ass. des Chimistes de Sucrerie et de Distillerie, 1905, Bd. 23, S. 393. *Ehrlich, (1) Zeitschr. d. Vereins d. Deutschen Zuckerindustrie, 1905, Bd. 55, S. 539. *van Ekenstein, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1897, Bd. 125, S. 719. — (2) Récueil des travaux chim. des Pays-Bas, 1896, Bd. 15, S. 221. *Elion, H., (1) Zeitschr. f. angew. Chemie, 1890, S. 322. *Elwart, (1) Bulletin de l'assoc. des Chimistes, 1901, Bd. 20, S. 562. *Emmerling, O., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1902, Bd. 35, S. 694. — (2) Ebenda, 1899, Bd. 32, S. 544. — (3) Ebenda, 1896, Bd. 29, S. 2726. — (4) Ebenda, 1897, Bd. 30, S. 451. — (5) Z. f.

Spiritusindustrie, 1904, Bd. 27, S. 477. ***Faget,** (1) Liebigs Ann., 1853, Bd. 88, S. 325. — (2) Ebenda, 1862, Bd. 124, S. 355. ***Fehling,** (1) Dinglers Journ., 1853, Bd. 130, S. 77. ***Fischer,** A., (1) Liebigs Ann., 1860, Bd. 115, S. 247; 1861, Bd. 118, S. 307. ***Fischer,** Emil, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1894, Bd. 27, S. 2988 u. 3251. — (2) Ebenda, 1895, Bd. 28, S. 3037. — (3) Verhandl. d. Ges. Deutscher Naturforscher u. Aerzte, 66. Vers., Wien 1895, Bericht, S. 109. — (4) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1887, Bd. 20, S. 1089 u. 3384; 1888, Bd. 21, S. 2634; 1889, Bd. 22, S. 97 u. 106. — (5) Ebenda, 1894, Bd. 27, S. 2031. — (6) Ebenda, 1889, Bd. 22, S. 3218. — (7) Ebenda, 1890, Bd. 23, S. 2226. ***Fittig,** (1) Zeitschr. f. Chemie, 1867, Bd. 2, S. 44. ***Fitz,** Albert, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1877, Bd. 10, S. 278. — (2) Ebenda, 1880, Bd. 13, S. 36. ***Förster,** K., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1882, Bd. 15, S. 322. ***Frankland,** Percy F., (1) Transactions Chem. Soc., 1891; Chemical News, 1891, Bd. 63, S. 136. — (2) Journal Chemical Soc., 1891, Bd. 59, S. 253; 1892, Bd. 60, S. 432 u. 737. — (3) Ebenda, 1892, Bd. 60, S. 254. ***Frey,** H., (1) Schweizer. Wochenschr. f. Pharmazie, 1891, Bd. 29, S. 111. ***Gay-Lussac,** (1) Ann. de chim. et de phys., 1815, Bd. 95, S. 318. ***Gayon** U., und **Dubourg,** E., (1) Ann. Pasteur, 1901, Bd. 15, S. 527. ***Gayon und Dupetit,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1886, Bd. 103, S. 883. — (2) Ann. Pasteur, 1901, Bd. 15, S. 527. ***Gentil,** (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1898, Bd. 21, S. 16. ***Geuther,** (1) Liebigs Ann., 1863, Bd. 126, S. 63. ***Giltay,** E., (1) Jahrb. wiss. Bot., 1896, Bd. 30, S. 71. ***Giltay und Aberson,** (1) Jahrb. wiss. Bot., 1894, Bd. 26, S. 543. ***Grimbert,** L., (1) Comptes rendus Soc. de Biologie, 1896, S. 191 u. 260, und Ann. Pasteur, 1896, Bd. 10, S. 708. — (2) Comptes rendus Soc. de Biologie, 1896, S. 192 u. 684. — (3) Ann. Pasteur, 1893, Bd. 7, S. 353. ***Grimm,** (1) Liebigs Ann., 1871, Bd. 157, S. 264. ***Grönlund,** Chr., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1892, Bd. 15, S. 281. ***Grüss,** J., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1904, Bd. 27, S. 686 u. 771. — (2) W. f. Brauerei, 1901, Bd. 18, S. 336. — (3) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1902, Bd. 20, S. 36. ***Gruber,** Max, (1) Arch. f. Hyg., 1893, Bd. 16, S. 35. ***Guérin,** G., (1) Journ. de Pharm. et de Chim., 1898, 6. sér., Bd. 7, S. 323. ***Halenke und Kurtz,** (1) Liebigs Ann., 1871, Bd. 157, S. 270. ***Hansen,** E. Chr., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1888, Bd. 11, S. 417. — (2) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1884, Bd. 2, S. XXXII. ***Hartmann,** (1) W. f. Brauerei, 1903, Bd. 20, S. 113. ***Heim,** Carl, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1898, Bd. 21, S. 155 u. 258. ***Henneberg,** W., (1) W. f. Brauerei, 1903, Bd. 20, S. 178. ***Henninger,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1882, Bd. 95, S. 94. ***Hérissey,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1901, Bd. 133, S. 49. ***Hilger,** A., (1) Forschungsberichte ü. Lebensmittel usw., 1894, Bd. 1, S. 132. ***Hoppe-Seyler,** F., (1) Physiolog. Chemie. Berlin 1877, Bd. 1, S. 116, und Arch. f. Hyg., 1876, Bd. 12, S. 14. — (2) Medic.-chem. Untersuchungen, S. 216. ***Inui,** (1) W. f. Brauerei, 1902, Bd. 19, S. 218. ***Iwanowski,** D., (1) Bulletin de l'Acad. imp. des sciences de St. Pétersbourg, 1893; ref. in Kochs Jahresb., 1894, Bd. 5, S. 116. ***Jaksch,** (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1886, Bd. 19, Rep., S. 782. ***Jodlbauer,** Max, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1888, Bd. 11, S. 252. ***Kayser,** Edm., (1) Ann. Pasteur, 1893, Bd. 7, S. 41. — (2) Ebenda, 1891, Bd. 5, S. 456. ***Kayser und Dienert,** (1) Bulletin de l'Assoc. des Chimistes, 1901, Bd. 19, S. 353. ***Kerry,** R., und **Fraenkel,** S., (1) Monatshefte f. Chemie, 1890, Bd. 11, S. 268. ***Khoudabachian,** (1) Ann. Pasteur, 1892, Bd. 6, S. 600. ***Kiticsán,** (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1883, Bd. 16, S. 1179. ***Klöcker,** Alb., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 129. ***Koehler,** Julius, (1) Mitt. d. Oesterr. Versuchsstation f. Brauerei u. Mälzerei, Wien, 1892, Heft 5. ***Kolbe,** (1) Liebigs Ann., 1860, Bd. 113, S. 244. ***Korff,** Gustav, (1) Dissert., Erlangen 1898; Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 465. ***Kosutány,** (1) Landw. Versuchsstationen, 1898, Bd. 49, S. 174. — (2) Ebenda, 1892, Bd. 40, S. 217. ***Kozai,** Y., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1900, Bd. 6, S. 385. ***Krämer,** G., und **Pinner,** A., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1869, Bd. 2, S. 401; 1870, Bd. 3, S. 75. ***Kramer,** Ernst, (1) Landw. Versuchsstationen, 1890, Bd. 37, S. 325. — (2) Oesterr. landwirtsch. Centralbl., 1891, Bd. 1, S. 30. ***Kruis und Rayman,** (1) Mitt. d. Versuchsstation f. Spiritusindustrie in Prag, 1891, Bd. 1. — (2) Z. f. Spiritusindustrie, 1896, Bd. 19, S. 131. — (3) Bull. intern. de l'Acad. des Sciences de l'Empereur François Joseph I, Classe des Sciences math. et nat., Prag, 1894, Bd. 1. — (4) Z. f. Spiritusindustrie, 1904, Bd. 27, S. 311. ***Krutzsch,** (1) J. f. prakt. Chem., 1844, Bd. 31, S. 1. — (2) Liebigs Ann., 1844, Bd. 52, S. 311. ***Kulisch,** Paul, (1) Z. f. angew. Chem., 1896, S. 418. ***Laborde,** J., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1899, Bd. 129, S. 344. ***van Laer,** Henri, (1) Bulletin de l'Assoc. Belge des Chimistes, 1890, Bd. 16, S. 177. — (2) W. f. Brauerei, 1894, Bd. 11, S. 353. ***Lange,** H., (1) Chem.-Ztg., 1902, Bd. 26, S. 200. ***Lasché,** A., (1) Der amerikanische Braumeister, 1892, 20. Febr.; ref. in Kochs Jahresb., 1892, Bd. 3, S. 144. — (2) Ebenda, 1891, 10. Jan.; ref. in Kochs Jahresb., 1892, Bd. 3, S. 142. ***Lavoisier,** Ant. L., (1) Oeuvres, Bd. 3, S. 780; System der antiphlogistischen Chemie, übersetzt v. Hermbstädt, Berlin u. Stettin 1792, S. 161. ***Laxa,** Ottokar, (1) Arch. f. Hyg., 1902, Bd. 41, S. 119. ***Lenz,** Wilh., (1) Zeitschrift f. öffentl. Chemie, 1899, Bd. 5, S. 258. ***Liebermann,** (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges.,

1882, Bd. 15, S. 437 u. 2553. ***Lindet,** L., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1891, Bd. 112, S. 102 u. 663. — (2) Ebenda, 1888, Bd. 107, S. 182. — (3) Ebenda, 1890, Bd. 111, S. 236. ***Lindet** und **Marsais,** (1) Annales de la Brasserie et de la Distillerie. 1905, S. 3. ***Lindner,** Paul, (1) Mikroskop. Betriebskontrolle in d. Gärungsgewerben. 3. Aufl., Berlin 1901, S. 109 u. 380. — (2) W. f. Brauerei, 1900, Bd. 17, S. 713. — (3) Ebenda, 1897, Bd. 14, S. 546. — (4) Mikrosk. Betriebskontrolle etc., S. 380. — (5) Ebenda, S. 385 u. 389. ***Lintner,** C. J., (1) Zeitschr. f. angew. Chem., 1896, S. 538. ***Lippmann,** E. O. **von,** (1) Die Chemie der Zuckerarten. Braunschweig 1904. — (2) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1887, Bd. 20, S. 1001. ***Ludwig,** Ernst, (1) Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wiss. zu Wien, math.-nat. Kl., 1867, Bd. 56, 2. Abt., S. 287. ***Mach** und **Portele,** (1) Landw. Versuchsstationen, 1892, Bd. 41, S. 233. ***Maercker,** Max, (1) Handbuch d. Spiritusfabrikation. 8. Aufl., Berlin 1903, S. 71. — (2) Ebenda, S. 392. — (3) Ebenda, S. 762. — (4) Ebenda, S. 496. ***Marckwald,** (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1902, Bd. 35, S. 1595. ***Mastbaum,** Hugo, (1) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel usw., 1903, Bd. 6, S. 49. ***Mayer,** Adolf, (1) Landw. Versuchsstationen, 1873, Bd. 16, S. 277. ***Mehring,** (1) Z. f. physiolog. Chem., 1881, Bd. 5, S. 196. ***Meissl,** (1) J. f. prakt. Chem., 1880, Bd. 22, S. 100. ***Morin,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1888, Bd. 106, S. 360. ***Morin** und **Cloudon,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1887, Bd. 104, S. 1109. ***Morris,** G. H., (1) Chemical News, 1895, Bd. 71, S. 196. ***Moritz,** J., (1) Chem.-Ztg., 1886, Bd. 10, S. 322. ***Nägeli,** Carl, (1) Theorie der Gärung. München 1879. ***Nägeli** und **Loew,** (1) Sitzungsber. d. Bayer. Akad. d. Wiss., math.-nat. Kl., 1878, Bd. 8, S. 173. ***Nathan,** (1) W. f. Brauerei, 1903, Bd. 20, S. 397. ***Nencki,** (1) J. f. prakt. Chem., 1883, Bd. 17, S. 105. ***Ordonneau,** Ch., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1886, Bd. 102, S. 217. ***Oser,** Joh., (1) Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wiss. zu Wien, math.-nat. Kl., 1867, Bd. 56, S. 489. ***Pasteur,** L., (1) Ann. de chim. et de phys., 1860, 3. sér., Bd. 58, S. 324. — (2) Die Alkoholgärung. Deutsch von Griessmayer. Augsburg 1887, S. 27. — (3) Études sur les vins etc., S. 636. ***Payen,** A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1859, Bd. 49, S. 521. ***Pedersen,** Rasmus, (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1878, Bd. 1, S. 38. ***Pedler,** (1) Liebigs Ann., 1868, Bd. 147, S. 243. ***Pellet,** (1) Ref. in Chem.-Ztg., 1900, Bd. 24, S. 356. ***Pelouze** und **Liebig,** (1) Liebigs Ann., 1836, Bd. 19, S. 241. ***Perdrix,** L., (1) Ann. Pasteur, 1891, Bd. 5, S. 286. ***Péreire** und **Guignard,** (1) D.R.P. 139387; Z. f. Spiritusindustrie, 1903, Bd. 26, S. 131. ***Petkow,** (1) Ref. in Chem.-Ztg., 1902, Bd. 26, S. 41. ***Pichi,** P., (1) Ann. d. Scuola Enolog. in Conegliano, 1892, Bd. 1, S. 1. ***Pierre** und **Puchot,** (1) Liebigs Ann., 1869, Bd. 151, S. 299. ***Pringsheim,** Hans H., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1905, Bd. 38, S. 486. ***Prior,** Eugen, (1) Chemie u. Physiologie d. Malzes u. d. Bieres. Leipzig 1896, S. 397. — (2) Bayer. Brauerjournal, 1895, Bd. 5, S. 49. ***Prinsen-Geerligs,** (1) Ref. in Chem.-Ztg., 1897, Bd. 21, S. 150. ***Rabuteau,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1878, Bd. 87, S. 500. ***Rapp,** Rudolf, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1896, Bd. 29, S. 1983. ***Rau,** Alfr., (1) Arch. f. Hyg., 1892, Bd. 14, S. 225. ***Riss,** (1) Zeitschr. d. landw. Vereins in Bayern, 1891; ref. in Kochs Jahresb., 1891, Bd. 2, S. 170. ***Ritthausen,** H., (1) Chem.-Ztg., 1897, Bd. 21, S. 717. ***Rommier,** A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1890, Bd. 110, S. 1341. ***Röser,** (1) Ann. Pasteur, 1893, Bd. 7, S. 41. ***Salkowski,** E., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1894, Bd. 27, S. 497 u. 925. — (2) Z. f. physiolog. Chem., 1900, Bd. 30, S. 478. ***Sanson,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1888, Bd. 106, S. 208. ***Schardinger,** Franz, (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1890, Bd. 8, S. 144. ***Scheele,** K. W., (1) Crells Annalen, 1785, Bd. 1, S. 61. ***Schiönning,** H., (1) Ref. in Chem.-Ztg., 1895, Bd. 19, S. 225. ***Schmidt,** C., (1) Handwörterbuch der Chemie, 1848, Bd. 3, S. 224. ***Schrötter,** Hugo, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1879, Bd. 12, S. 1431. ***Schultze,** (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1890, Bd. 23, S. 2579. — (2) Chem.-Ztg., 1893, Bd. 17, S. 1263. — (3) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1889, Bd. 22, S. 1192; 1891, Bd. 24, S. 2277. ***Schunck,** Edward, (1) Memoirs of the Manchester Literary and Philosophical Society, 1853/1854; Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1898, Bd. 31, S. 309. ***Schüpphaus,** (1) Journ. of the Americ. Chem. Society, 1892, Bd. 14, S. 45. ***Schützenberger,** Paul, (1) Die Gärungserscheinungen. 1876. — (2) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1874, Bd. 7, S. 192. ***Schwarz,** (1) Liebigs Ann., 1852, Bd. 84, S. 82. ***Sclavo** und **Gosio,** (1) Stazioni sperim. agrar. ital., 1890, Bd. 19, S. 540. ***Steuber,** L., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1900, Bd. 23, S. 3. ***Stöhr,** (1) J. f. prakt. Chem., 1893, Bd. 47, S. 439. ***Stone,** W. E., und **Tollens,** B., (1) Liebigs Ann., 1888, Bd. 249, S. 257. ***Straub,** (1) Forschungsber. ü. Lebensmittel usw., 1895, Bd. 2, S. 382. ***Strecker,** (1) Liebigs Ann., 1854, Bd. 92, S. 80. ***Tanret,** C., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1888, Bd. 106, S. 418. ***Thomas,** Pierre, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1903, Bd. 136, S. 1015. — (2) Ebenda, 1902, Bd. 134, S. 610. ***Thudichum,** (1) J. f. prakt. Chem., 1882, Bd. 25, S. 19; 1896, Bd. 53, S. 49. ***Thylmann** und **Hilger,** (1) Arch. f. Hyg., 1888, Bd. 8, S. 451. ***Tollens,** B., (1) Handbuch der Kohlenhydrate. Breslau 1895 u. 1896. — (2) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1898, Bd. 31, S. 2150. — (3) J. federated Inst.

Brewing, 1898, Bd. 4, S. 438; J. f. Landwirtschaft, 1901, Bd. 49, S. 29. ***Tollens,** B., und **Glaubitz,** H., (1) J. f. Landwirtschaft, 1897, Bd. 45, S. 97. ***Traube,** Moritz, (1) Theorie der Fermentwirkungen. Berlin 1858, S. 105. ***Trommsdorf,** (1) Tageblatt d. Frankfurter Naturforschervers. 1867, S. 52. ***Tsukamoto,** Michito, (1) Bullet. College Agric. Tokio, 1897, Bd. 2, S. 406. ***Udránsky,** (1) Z. f. physiolog. Chem., 1889, Bd. 13, S. 539. ***Ulpiani** und **Sarcoli,** (1) Atti R. Accad. dei Lincei, Roma, 1902, Bd. 11, II, S. 173. ***Wagner,** (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1888, Bd. 21, S. 1238. ***Ward,** H. M., (1) Proceedings Royal Soc. London, 1892, Bd. 50, Nr. 304 u. 305. ***Went** und **Prinsen-Geerligs,** (1) Die Deutsche Zuckerindustrie, 1894, Bd. 19, S. 1043. ***Windisch,** K., (1) Ref. in Chem.-Ztg., 1901, Bd. 25, S. 240. — (2) Ebenda, 1902, Bd. 26, S. 865. — (3) Arb. Kais. Ges.-Amt, 1892, Bd. 8, S. 175. — (4) Ebenda, 1895, Bd. 11, S. 285. — (5) Die chem. Untersuchung u. Beurteilung d. Weines. Berlin 1896, S. 42 u. 43. ***Windisch,** W., (1), W. f. Brauerei, 1899, Bd. 16, S. 653. — (2) Ebenda, 1898, Bd. 15, S. 189. ***Winkler,** (1) Jahresber. f. prakt. Pharmazie, Bd. 26, S. 209. ***Wohl,** (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1898, Bd. 31, S. 1796. ***Wolff,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1900, Bd. 131, S. 1323. ***Wortmann,** Jul., (1) Landw. Jahrbücher, 1894, Bd. 23, S. 552. — (2) Ebenda, 1898, Bd. 27, S. 631, und Chem.-Ztg., 1898, Bd. 22, S. 679. — (3) Landw. Jahrbücher, 1892, Bd. 21, S. 901. ***Wróblewski,** A., (1) J. f. prakt. Chem., 1901, Bd. 64, S. 1. ***Wurtz,** (1) Liebigs Ann., 1855, Bd. 93, S. 107. ***Wyschnegradsky,** (1) Liebigs Ann., 1878, Bd. 190, S. 350. ***Zopf,** W., (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1889, Bd. 7, S. 94.

(Manuskript-Einlauf: 30. Juli 1906.)

19. Kapitel.

Enzyme, welche Disaccharide und Polysaccharide spalten.

Von Dr. A. Bau.

§ 91. Die Invertase.

Als erst bekanntes und auch am meisten untersuchtes Enzym der Hefe ist die Invertase anzusehen, deren Synonyma die ursprüngliche Bezeichnung Invertin, dann Saccharase, Sucrase und Euinvertase sind.
Nach ihrem Vorkommen ist die Invertase eines der verbreitetsten 5 Enzyme. Im Tierkörper findet sie sich in zahlreichen Organen, vorwiegend in der Dünndarmschleimhaut besonders der Warmblüter, doch auch in Insekten haben Erlenmeyer und Ad. von Planta (1), sowie Axenfeld (1) u. a. sie konstatiert. Im Pflanzenreiche trifft man Invertase in den meisten Organen an, in Blättern, Blüten, Früchten (auch in 10 Hopfenzapfen) u. s. f., doch hier in wesentlich geringerer Menge als in den niederen Pilzen, den Schimmelpilzen, den Hefen und Bakterien.
Nicht in allen Fällen scheint die Invertase aus den verschiedenen Ursprungsorten identisch zu sein, ergeben sich doch Unterschiede in der Wirkungsweise des Enzymes je nach seiner Gewinnung in bezug auf die 15 Spaltung des Rohrzuckers, auf Zerstörungstemperaturen, auf Lösbarkeit und Filtrierbarkeit; vergl. Fernbach (1). Aus diesem Grunde schlug Bau (1) vor, das Invertin, welches in den echten Hefen vorkommt, als Euinvertase zu bezeichnen, bis eine weitere Forschung ergeben haben werde, ob die aus so verschieden geartetem Material erhaltenen, Rohr- 20 zucker spaltenden Enzyme wirklich übereinstimmen. Als hervorragendes Beispiel der Verschiedenheit der einzelnen Invertasen ist hier *Monilia candida* (s. S. 336) zu erwähnen, welche wohl Rohrzucker spaltet und

vergärt, aber zufolge FISCHER und P. LINDNER (1) echte Invertase nicht enthält. Das Enzym dieses Pilzes betrachtet HAHN (1) als Endoenzym, das möglicherweise an Protoplasma gebunden ist. Vielleicht ist hier auch nur ein Enzymogen vorhanden. Den Preßsaft aus *Monilia candida* studierten
5 BUCHNER und MEISENHEIMER (1): sie fanden, daß das Enzym nicht durch Pergamentpapier diffundiert und sich hierdurch auffallend von der Hefeninvertase unterscheidet.

Das Vorkommen der Invertase in Hefen ist ein ausgedehntes. Sie findet sich in allen Kulturhefen der Brauerei, der Brennerei und Preß-
10 hefenfabrikation, somit in allen Hefen vom Typus *Sacch. cerevisiae* der Ober- und Untergärung, sowohl der Frohberg-, wie der Saaz-Rassen, die wir als Typus OF, OS, UF und US bezeichnen (s. S. 429). Auch sämtliche echte Weinhefen enthalten Invertase. Dagegen mangelt dem *Schizos. octosporus* dieses Enzym; man vergl. S. 173—179. Aber auch in vielen
15 anderen Sproßpilzen findet sich Invertase. Nicht vorhanden ist sie in sämtlichen näher untersuchten Rassen des *Sacch. apiculatus* (s. S. 323) und in den meisten Torulaceen (s. S. 292). Von letzteren vergärt indessen HARTMANN's (1) *Torula colliculosa* den Rohrzucker flott, während andere Arten die Spaltung dieses Zuckers nicht zuwege bringen. Es
20 sind hier entschieden noch ausgedehntere Arbeiten nötig; denn in mehrfachen Fällen ist der Wert nur darauf gelegt worden, mittelst der genannten Organismen den Rohrzucker zu vergären, ohne in den einzelnen Fällen die Gegenwart der Invertase nachgewiesen zu haben.

In bezug auf die Darstellung der Invertase in möglichst reinem,
25 d. h. wirksamstem Zustande geht man fast stets von einer Rasse des *Sacch. cerevisiae* aus, sei diese obergärig oder untergärig. Die älteren Verfahren zur Gewinnung des Enzymes bezweckten zunächst, die Hefe durch Alkohol oder Aether abzutöten, um dann die Invertase durch Wasser oder Glycerin auszuziehen: man vergl. BERTHELOT (1), LIEBIG (1),
30 HOPPE-SEYLER (1), GUNNING (1), DONATH (1). Die erhaltene Lösung wird mit hochprozentigem oder absolutem Alkohol fraktioniert gefällt, bei welchem Verfahren die zuerst erhaltenen Fraktionen ein geringeres enzymatisches Vermögen besitzen als die später erzielten. Die Niederschläge werden mit absolutem Alkohol gewaschen und im Exsiccator
35 getrocknet. Andere Methoden der Gewinnung der Invertase bestehen darin, der Hefe nach BARTH (1) und AMTHOR (1) zunächst durch vorsichtiges Erwärmen die größte Menge ihres Wassergehaltes zu entziehen, sie darauf intensiver zu trocknen und das erhaltene Pulver zu extrahieren. Eine äußerst stark wirkende Invertaselösung wird dann er-
40 halten, wenn man nach O'SULLIVAN und TOMPSON (1) Hefe der Selbstgärung überläßt, oder aus ihr nach BUCHNER's Methode einen Preßsaft herstellt. Auch kann man nach ISSAEW (1) durch Behandeln der abgepreßten Hefe mit Rohrzucker durch Plasmolyse einen stark aktiven Zellsaft gewinnen, aus welchem der gelöste Rohrzucker durch Vergären-
45 lassen entfernt wird. Die verhältnismäßig reinsten Invertasepräparate sind indessen mittelst Glycerin- oder Wasser-Auszügen aus abgetöteter Hefe zu erzielen, sei diese Abtötung nun durch Behandeln mit Alkohol und Aether, oder noch besser durch Erhitzen der Hefe nach vorsichtigem Trocknen auf 100° und darüber erfolgt. Nach OSBORNE (1) digeriert man
50 die mit Alkohol getötete Hefe in mäßiger Wärme mit Chloroformwasser längere Zeit und gibt das Filtrat in 96-proz. Alkohol. Die ausgeschiedenen Flocken werden nach dem Waschen mit Alkohol und nach dem Trocknen im Verhältnis von 1 : 25 in Wasser gelöst, die noch vor-

handenen phosphorsauren Erden durch vorsichtigen Zusatz von Ammoniak gefällt, das Filtrat von diesen dialysiert und im Vakuum eingedampft. Zur Reinigung des Enzymes wandte Wróblewski (1) ebenfalls die Dialyse an; doch fällte er vorher die Invertase durch Sättigen ihrer Lösung mittelst Ammoniumsulfates.

Die Haupteigenschaft der Invertase besteht in der Hydrolyse des Rohrzuckers, welcher gemäß der Gleichung

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

in je ein Molekül d-Glucose und d-Fructose gespalten wird. Ob das Enzym außer Rohrzucker noch andere Kohlenhydrate hydrolysiert, ist fraglich; man vergl. darüber § 96.

Wie bereits auf S. 396 bemerkt worden ist, vermag die Hefe nicht, den Rohrzucker direkt zu vergären, sondern dieser muß zunächst durch die Invertase gespalten werden. Es fragt sich nun, ob diese Hydrolyse des Zuckers innerhalb oder außerhalb der Hefenzelle vor sich geht. Nach O'Sullivan (1) läßt die gesunde Hefenzelle Invertase nicht diffundieren; die Hydrolyse des Rohrzuckers muß daher vor der Vergärung im Innern der Zelle stattfinden. Der gleichen Ansicht ist auch Hiepe (1), welcher meint, daß die Hydrolyse in inniger Beziehung zum Zellplasma steht, und daß hierbei physiologische Gesetze eine ebenso große Rolle spielen wie chemische, und daß der Eintritt des Rohrzuckers in die Zelle, wie auch der Austritt der Inversionsprodukte aus derselben physiologische Prozesse sind. Nach Fernbach (1) lassen die Hefenzellen das Enzym um so langsamer heraustreten, je jünger sie sind. Pottevin und Napias (1) untersuchten in dieser Hinsicht fünf Hefen in Pepton-Rohrzuckerlösung und fanden, daß vier der geprüften Rassen schon im Anfang der Gärung Invertase an die Flüssigkeit abgaben, die fünfte aber nicht. Die vier ersten Hefen lieferten bei der Maceration mit Chloroformwasser kräftige Invertaselösungen, die fünfte Hefe dagegen nicht; bei der letzteren wurde erst nach vierzehntägigem Digerieren etwas Invertase abgeschieden. Die einzelnen Hefenrassen dürften sich also in der Abgabe des Enzymes an die umgebende Flüssigkeit verschieden verhalten. Im allgemeinen können wir aber annehmen, daß auch frische Hefenzellen sowohl der Gruppe des *Sacch. cerevisiae* wie der des *Sacch. ellipsoideus I* Invertase durch ihre Zellmembran diffundieren lassen; fanden doch Bau (2) und Donath (2) in allen gegorenen Getränken Invertase.

Auf das ständige Vorkommen dieses Enzymes im Bier z. B. gründet sich Bau's (3) Verfahren zum Nachweis ob ein Bier pasteurisiert worden sei. Je 20 ccm Bier werden das eine Mal aufgekocht, das andere Mal nicht aufgekocht, mit je 20 ccm einer 20-proz. Rohrzuckerlösung versetzt, während 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, mit 0,5 ccm Bleiessig vermengt, auf 50 ccm mit destilliertem Wasser aufgefüllt, filtriert und polarisiert. Findet man beim Vergleiche beider Proben einen erheblichen Unterschied in der Ablenkung des Drehungswinkels am Polarisationsapparat, so ist das Bier nicht pasteurisiert; sind die Untersuchungsresultate gleich, oder stimmen diese ungefähr überein (geringe Abweichungen bei der Ablesung am Polarisationsapparat sind auf Versuchsfehler zurückzuführen), so ist das Bier sicher pasteurisiert, und zwar wahrscheinlich bei Temperaturen, die 57° C überschritten hatten. In Ermangelung eines Polarisationsapparates kann man die Untersuchung auch wie folgt ausführen. Man kocht 5 ccm Fehling'scher Lösung mit 1 ccm der Flüssigkeit (40 ccm Bier + 40 ccm Rohrzuckerlösung nach vierundzwanzigstündiger Digestion). Bleibt die Flüssigkeit

blau mit geringem rotem Niederschlag, so ist Invertin nicht vorhanden, im entgegengesetzten Fall wird die Fehling'sche Lösung vollständig reduziert.

Die Enzymwirkung wird auch bei der Invertase in hohem Maße von der **Temperatur** beeinflußt. Während jene schon bei etwa 0° beginnt, liegt das *Optimum* erheblich höher. A. Mayer (1) fand als solches bei Invertase aus obergäriger Preßhefe 31 bis über 36° C. aus untergäriger Bierhefe 44—48°. Nach Kjeldahl (1) ist dagegen die günstigste Wirkungstemperatur für Invertin aus Unterhefe 52,5°, für das Enzym aus Oberhefe 56° C. Die Abweichungen dieser Zahlen voneinander erklären sich u. a. auch nach A. Mayer (1) zwanglos dadurch, daß einesteils die Invertasepräparate infolge ihrer Darstellung, z. B. durch Behandeln mittelst Alkohols, geschädigt wurden und andernteils Beimengungen, welche den Erzeugnissen anhafteten, je nach ihrer Natur von hemmendem oder von förderndem Einfluß auf die Enzymwirkung waren. Nach sehr sorgfältigen Versuchen haben O'Sullivan und Tompson (1) die Optimalwirkung bei 55—60° festgestellt. Auch die Angaben betreffend die *Zerstörungstemperatur* für dieses Enzym weichen erheblich voneinander ab, und zwar wohl aus den gleichen Gründen. So z. B. wirkt Alkohol herabstimmend auf die Zerstörungstemperatur, während eine starke Konzentration und die Gegenwart von Glycerin sie erhöht. Das länger andauernde Erhitzen auf eine gleichbleibende Temperatur wirkt ebenfalls schädigend. So finden wir bei A. Mayer (2) die Zerstörungstemperatur schon bei 51° angegeben, während nach anderen Versuchen desselben Forschers das Enzym bei 65° und selbst über 66° noch, wenn auch schwach, wirksam bleibt. Nach O'Sullivan und Tompson (1) liegt die Zerstörungstemperatur für Invertase bei 75°. Zu dem gleichen Ergebnis gelangte Bau (4), der das Enzym nicht rein darstellte, sondern nach Bokorny's (1) Vorgang direkt in der Zelle untersuchte. Bei diesem Verfahren vermeiden wir die jedenfalls stattfindende Schädigung der Enzyme durch den Versuch einer Reindarstellung; wir müssen dabei aber wieder in Kauf nehmen, daß bei wiederholten Proben nicht stets dieselbe Hefe in dem gleichen physiologischen Zustand zur Anwendung gelangt. Die Ernährungsverhältnisse der Hefe ändern ja an den Eigenschaften der Enzyme nichts; aber deren Menge und ihre Wirksamkeit kann durch Anhäufung oder Verminderung anderer Körper in der Hefenzelle beeinflußt werden. Nach weiteren vorliegenden Versuchen können wir annehmen, daß Invertase aus Hefe, falls sie ungeschwächt ist, ihre Optimalwirkung bei 52—56° entfaltet und daß sie bei 75° in wässriger Lösung oder auch in der Hefenzelle sicher zerstört wird. In absolut trocknem Zustand verträgt sie bei weitem höhere Temperaturen. Sowohl rein dargestellte Invertase, wie auch trockne Hefe kann nach A. Mayer (3) auf 97°, nach Bau (1) auf 100°, nach Buchner (1) auf 145° und nach Salkowski (1) selbst auf 160° erhitzt werden, ohne daß das Enzym seine Wirksamkeit einbüßt. Bei gewöhnlicher Temperatur getrocknete oder auf 105° erhitzte Hefe enthält zufolge Bau (4) noch nach 5 ¾ Jahren Invertase.

Zwecks Untersuchung des **Einflusses chemischer Agentien** auf die Invertase verfolgte Bokorny (1) das Prinzip, diese Mittel auf die Hefe selbst einwirken zu lassen, um so eine durch die Darstellung der Invertase bewirkte eventuelle Schädigung des Enzyms zu vermeiden. Nach ihm bleibt die Invertase erhalten, wenn bei Zimmertemperatur Hefe drei Tage in absolutem, oder 20 Tage in 50—75-proz. Alkohol aufbewahrt

wird. Ebenso wird das Enzym nicht geschädigt beim zweitägigen Aufbewahren der Hefe in Lösungen mit 0,25—0,50 Proz. Oxalsäure, 0,1 bis 0,5 Proz. Fluorwasserstoff, 2 Proz. Essigsäure, 2 Proz. Milchsäure oder 5 Proz. Formaldehyd. Auch vernichten geringe Mengen mineralischer Säuren und Alkalien, ferner Arsenite, Blausäure, Chloroform, Phenole, 5 Toluol und Thymol, welch letztere beiden Emil Fischer und P. Lindner (1) bei ihren Enzymstudien anwandten, die Enzymkraft nicht. In gleicher Weise untersuchte Bau (4) Hefe durch Digerieren bei 12—17° während 29 Stunden. Es ergab sich, daß die Invertase zerstört war durch Behandeln der Hefe mit: Natriumhydroxyd von 1 Proz. und 0,5 Proz., 10 Silbernitrat 0,1 Proz.; eine Schwächung war nachzuweisen bei 0,1 Proz. Quecksilberchlorid, während Lösungen geringerer Konzentration ohne Einfluß waren. Ebensowenig hatte die Invertase durch Einwirkung von organischen Säuren, darunter Weinsäure von 4 Proz. Gehalt, gelitten.

Ueber den Einfluß des Lichtes auf Invertase gehen die Angaben der 15 Forscher auseinander. A. Mayer (4) und Emmerling (1) konnten einen solchen nicht konstatieren. Nach Downes und Blunt (1), sowie nach Duclaux (1) hingegen soll das Enzym besonders bei Zutritt von Luft gegen Belichtung sehr empfindlich sein. Stark verdünnte Säuren sind für die höchste Wirkung der Invertase förderlich, und zwar müssen 20 anorganische Säuren in schwächerer Gabe angewandt werden, als organische, so daß z. B. nach Fernbach (2) 0,0025 Proz. der Lösung an Schwefelsäure die Optimalwirkung des Zusatzes bedingen, während dieselbe bei Essigsäure erst bei 1 Proz. liegt. Uebrigens weichen in betreff dieser Frage die Angaben der einzelnen Forscher, wie Kjeldahl (1), 25 Dumas (1), Nasse (1), Loew (1), O'Sullivan und Tompson (1), Fernbach (1), öfter voneinander ab, was wohl auf Invertasen verschiedener Herkunft und Darstellungsweisen und auf ihnen noch anhaftende fremde Stoffe zurückzuführen sein dürfte. Kohlensäure wirkt nach Nasse (2) beschleunigend auf die Hydrolyse mittelst dieses Enzymes, Kohlenoxyd 30 und Sauerstoff dagegen sehr nachteilig. Alle Alkalien und alkalisch reagierenden Salze bewirken zufolge Duclaux (1), O'Sullivan und Tompson (1), Fernbach (1) bereits in geringer Menge eine starke Schädigung der Wirkung. Geringe Mengen der Chloralkalien und des Chlorcalciums sind nach Nasse (1) und Duclaux (1) von günstigem Einfluß. Salze der 35 Schwermetalle wirken dagegen schädlich. Alkohol zeigt schon bei 5—10 Proz. nach A. Mayer (5), J. Moritz (1) und O'Sullivan und Tompson (1) eine hemmende Wirkung auf die Hydrolyse, ebenso Salicylsäure nach Griffith (1) in geringer Menge.

Gegenüber anderen Enzymen scheint Invertase völlig unver- 40 änderlich zu sein. Schon A. Mayer (6) fand, daß sie von Fäulnisbakterien nicht angegriffen wird, wenn auch der Versuch dieses Forschers nicht ganz einwandfrei ist, da nach Fermi und Montesano (1) einzelne Bakterien selbst Invertase abscheiden, so daß der Nachweis fehlt, ob die in dem gefaulten Produkt vorhandene Invertase noch aus der Hefe stammte, 45 oder vielleicht von den Bakterien selbst secerniert worden war. Bau (4) untersuchte den Einfluß der Hefenenzyme aufeinander, von denen hier natürlich nur die Hefenendotryptase (s. d. 20. Kap.) oder die Hefenpeptase in Frage kommen konnte. Hefe, welche bei 45° verflüssigt war, oder Hefenpreßsaft, der acht Tage bis drei Wochen bei 17—20° stehen blieb 50 oder eine Stunde lang auf 30 oder 40° erhitzt worden war, enthielt noch ungeschwächte Invertase. Dieses Enzym blieb ebenfalls in seiner Wirkung unverändert, wenn Hefe mit einer Lösung, enthaltend die

außerordentliche große Menge von 1 Proz. Pepsin (MERCK) und 0,1 Proz. Salzsäure 24 Stunden bei 37° digeriert wurde. Allerdings wurde in diesen Fällen keine Untersuchung darüber angestellt, in welchen quantitativen Mengen die Invertase in der Hefe vor und nach der Behand-
5 lung mit Hefenendotryptase bezw. Pepsin vorhanden war.

Die quantitative Bestimmung der Invertase ist bereits versucht worden, doch haftet der von FERNBACH (3) vorgeschlagenen Methode, wie allen Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Enzymen, der Nachteil an, daß man nur die Wirkung, nicht aber die wirklich vor-
10 handene Menge des Enzymes messen kann. Nach FERNBACH gibt man zu je 4 ccm einer 50-proz. Rohrzuckerlösung (genau gemessen) 1, 2, 3 usw. ccm der zu prüfenden Invertaselösung, versetzt das Gemisch mit 1 ccm Zehntelnormal-Essigsäure und füllt auf 10 ccm auf. Die so beschickten Reagensgläser erwärmt man im Wasserbad eine Stunde auf
15 56°, kühlt sie rasch ab, fügt zur Aufhebung der Enzymwirkung einige Tropfen Natronlauge hinzu und bestimmt den gebildeten Invertzucker mittelst FEHLING'scher Lösung. Als Einheit der Invertasemenge gilt nach FERNBACH diejenige, welche bei 56° C und in Gegenwart von 1 Proz. Essigsäure 0,2 g Rohrzucker innerhalb einer Stunde hydrolysiert.
20 Die Hydrolyse des Rohrzuckers mittelst Hefe soll nach MORITZ und MORRIS (1) in einigen englischen Brauereien praktische Anwendung erfahren, indem man Brauereihefe mit der Rohrzuckerlösung bei 56° digeriert und das Inversionsgemisch in den Hopfenkessel laufen läßt.

Auch in der chemisch-analytischen Praxis wird Invertase zur Be-
25 stimmung des Rohrzuckers in solchen Fällen angewandt, in denen weder durch direkte Polarisation noch durch die Inversionsmethode nach CLERGET-HERZFELD sichere Resultate zu erzielen sind. Nach den „Vereinbarungen zur einheitlichen Untersuchung von Nahrungs- und Genußmitteln“ (1) fügt man zu 100 ccm der zu untersuchenden Lösung, z. B. einer zehn-
30 proz. Maniglösung, 50 ccm einer nach Vorschrift bereiteten Invertaselösung und läßt die Mischung zwei Stunden lang bei 50—55° C stehen. Hierauf wird die Invertzuckerbestimmung polarimetrisch oder gewichtsanalytisch ausgeführt.

§ 92. Die Maltase.

35 Während man früher glaubte, daß die Maltose direkt vergärbar sei, haben wir bereits auf S. 396 gesehen, daß auch dieser Zucker einer hydrolytischen Spaltung unterliegt, bevor er von der Alkoholase angegriffen werden kann.

Die Maltose, welche DUBRUNFAUT zuerst entdeckte, ist auch unter
40 dem Namen Malzzucker bekannt und besitzt im wasserfreien Zustande dieselbe empirische Zusammensetzung wie der Rohrzucker, nämlich $C_{12}H_{22}O_{11}$. Ihre Komponenten sind indessen nicht wie bei dem letzteren, zwei verschiedene „einfache“ Zuckerarten, sondern sie besteht aus zwei Molekülen d-Glucose, welche sich unter Wasseraustritt zu Maltose
45 kondensiert haben. Sie findet sich in der Natur meist in geringer Menge in den Blättern verschiedener Pflanzen und bildet sich nach PURIEWITSCH (1) beim Keimen der Samen; auch in gekeimter Gerste, mithin im Grünmalz wie im Darrmalz, wurde sie von zahlreichen Forschern aufgefunden, so von O'SULLIVAN, von BROWN und MORRIS (1), von JALO-
50 WETZ (1) u. a., während von anderer Seite, so von DÜLL (1), LINTNER (1),

KRÖBER (1), das Vorkommen dieses Zuckers im Malz verneint oder als unsicher hingestellt wird. Die abweichenden Resultate erklären sich zu einem Teile dadurch, daß einige Forscher das Malz zwecks Untersuchung auf Zuckergehalt mit Wasser auszogen, bei welchem Verfahren die Diastase bereits auf die Stärke einwirken konnte, während andere Autoren die Diastase vor der Extraktion zu zerstören versuchten. Ob nun in dem Malze tatsächlich Maltose bereits enthalten ist oder nicht, erscheint für die Praxis der Gärungsindustrie aber belanglos, denn die Maischverfahren in der Brauerei und Brennerei bezwecken gerade eine mehr oder minder große Umwandlung der in den Cerealien enthaltenen Stärke in Maltose.

In der Brennerei wie in der Preßhefenfabrikation bestrebt man sich, eine möglichst weitgehende Verzuckerung der Stärke durch die Diastase zu erzielen, während man in der Brauerei es sich angelegen sein läßt, je nach der gewünschten Biersorte den Verzuckerungsprozeß unter Anwendung von mehr oder minder hochgedarrtem Malz so zu leiten, daß man in der Würze weniger oder mehr Maltose erhält, je nachdem man schwachvergorene, vollmundigere, oder stark vergorene, weinige Biere erzeugen will. In dieser Beziehung spricht man von dem Vergärungsgrad der Biere, der aber nicht ausschließlich vom Maischverfahren abhängt, sondern auch von der angewandten Betriebshefe (s. Bd. V, S. 149) mit bedingt wird.

Maltose wird durch Säuren hydrolysiert, doch erfolgt diese Umsetzung, bei welcher sich zwei Moleküle d-Glucose bilden, ungleich schwieriger als bei dem Rohrzucker. Dagegen wird Maltose durch ein Hefenenzym leicht gespalten, durch die Maltase. Ein derartiges Enzym fand im Mais schon GÉDULD (1) auf und bezeichnete es als Glucase; indessen wiesen spätere Forscher, so LINTNER und KRÖBER (1), die Nichtidentität dieses Enzymes mit demjenigen aus der Hefe nach.

Die Maltase wurde von EMIL FISCHER (1) in der Hefe entdeckt, nachdem bereits LINTNER (2) auf die Möglichkeit des Vorkommens eines Maltose spaltenden Enzymes in der Hefe hingewiesen hatte. Die ursprüngliche Bezeichnung für das letztere war Glucase oder Glycase, mit dem näheren Zusatz auch Hefenglycase, doch lag zu jener Zeit die Benennung der Enzyme noch im argen, welche ihren Namen teils von den Produkten, welche sie erzeugten, teils von den Zuckerarten, die sie spalteten, erhielten; vergl. W. WINDISCH (1). Erst später ist der Name Maltase für das Maltose spaltende Enzym allgemein angenommen worden. Um jede Zweideutigkeit zu beheben, schlug E. O. VON LIPPMANN (1) eine neue Nomenklatur vor, nach welcher das Enzym durch einen Doppelnamen bezeichnet wird, dessen erster Teil den zu spaltenden Zucker, dessen zweiter Teil das Erzeugnis, bezw. das Hauptprodukt der Hydrolyse angibt. Nach diesem Vorschlag würde das Maltose spaltende Enzym als Maltoglycase, bezw. Maltoglucase zu bezeichnen sein, jedoch hat sich dieser Name noch nicht eingebürgert.

Das Vorkommen der Maltase erstreckt sich auf alle Stämme von Kulturhefen des *Sacch. cerevisiae* in den Typen UF, US, OF und OS, sowie auf alle Weinhefen und die meisten wilden Hefen; man vergl. S. 173—178 und S. 179 u. f. Ein ganz besonderes Interesse beansprucht die *Torula colliculosa* HARTMANN's (1); vergl. S. 292. Außer in Hefen kommt Maltase, wie schon bemerkt, im Mais vor, auch in Schimmelpilzen (s. S. 249), in Rüben, Erbsen und Kartoffeln, sowie in Cerealien; vergl. BEIJERINCK (1) und STOKLASA und CZERNY (1). Die in der Gerste

nur in geringem Maße vorhandene enzymatische Wirkung auf Maltose läßt die Vermutung aufkommen, daß der Gerste, wie dem Weizen, Roggen und Reis, an sich ein Gehalt an Maltase nicht eigentümlich ist, sondern daß dieser von anhaftenden Schimmelpilzen und Hefen herrührt (vergl. 5 hierzu § 95). Forschungen nach dieser Richtung hin würden jedenfalls zur Kenntnis der Verbreitung der Maltasen beitragen.

Die sogen. Reindarstellung der Maltase stößt auf Schwierigkeiten, weil dieses Enzym einesteils zufolge E. Fischer (1) und Lintner und Kröber (1) wenig oder nicht leicht löslich in Wasser ist, anderen- 10 teils gegen Alkohol, der ja gewöhnlich zur Fällung der Enzyme gebraucht wird, sehr empfindlich ist. Auch läßt es sich nicht von der Invertase trennen, so daß nach Emmerling der *Schizosaccharomyces octosporus*, der das letztere Enzym nicht enthält, das beste Ausgangsmaterial für die Darstellung der Maltase wäre.

15 Das Wirkungsoptimum dieses Enzymes liegt nach den Forschungen von Lintner und Kröber (1) bei 40°, während dasjenige für die Glucase Géduld's (1) von 57—60° schwankt. Schon hieraus geht hervor, daß die einzelnen Maltose spaltenden Enzyme nicht identisch sind, so daß man gut tut, bei dem Enzym der Hefen nicht schlechthin 20 von Maltase zu sprechen, sondern dieses stets als Hefenmaltase zu bezeichnen.

Die Zerstörungstemperatur stellten Lintner und Kröber (1) bei 55° fest, welche Temperaturgrenze Bau (4) bestätigen konnte. Trockene Maltase ist gegen Temperaturerhöhungen widerstandsfähiger. Zwar fand 25 Bokorny (1), daß in einer „Preßhefe" beim Trocknen die Maltase zerstört wurde, doch hatten bereits E. Fischer (1) sowie Lintner und Kröber (1) dargetan, daß Maltase vorsichtiges Austrocknen übersteht. Nach Bau (4) bleibt das Enzym erhalten, wenn man obergärige oder untergärige Hefe bei gewöhnlicher Temperatur oder bei 35—37° trocknet, 30 die trockene Hefe dann mehrere Stunden auf 105° erhitzt, wobei allerdings die Maltase schon etwas geschwächt wird, oder die Trockenhefe über 5 Jahre aufbewahrt. Nach Bau ist jedoch die Maltase gegen Austrocknen bedeutend empfindlicher als die Invertase, so daß zwischen seinen und Bokorny's Angaben erhebliche Widersprüche nicht bestehen.

35 Den Einfluß chemischer Reagentien studierte insbesondere Bokorny (1) in derselben Weise wie bei der Invertase (s. S. 410). Es zeigte sich Maltase in der „Preßhefe" empfindlicher, als solche in „Bierbrauereihefe". Das Enzym blieb unverändert nach Einwirkung von 0,5-proz. Lösungen der Milchsäure und Oxalsäure, der Natronlauge, von 40 0,1 Proz. Schwefelsäure und Phenol und von Chloroformwasser (siehe darüber auch S. 415), mehr oder minder stark geschwächt wurde es durch Schwefelsäure von 0,5 Proz., Essigsäure von 1 Proz., Formaldehyd und Thymol von 0,1 Proz., Terpentin von 0,001 Proz. und Alkohol von 5 Proz. Zerstört war die Maltase nach Anwendung von 0,1 Proz. Salz- 45 säure, 1 Proz. Oxalsäure, Natronlauge oder Phenol, 0,02 Proz. Sublimat, 0,01 Proz. Silbernitrat und 10 Proz. Alkohol. In ähnlicher Behandlung von untergäriger Bierhefe UF wurde nach Bau (4) die Maltase vernichtet durch: Essigsäure 1 Proz., Oxalsäure 1 und 0,5 Proz., Milchsäure 1 Proz., Weinsäure 4 Proz., Schwefelsäure 1 und 0,5 Proz., Salzsäure 0,91 Proz., 50 Natriumhydroxyd 1 Proz., Silbernitrat 0,1, 0,02, 0,01 Proz., Sublimat 0,1 Proz.; geschädigt wurde das Enzym durch Oxalsäure 0,2 Proz., kohlensaures Natron 1 Proz., Natriumhydroxyd 0,5 Proz., Quecksilberchlorid 0,02 Proz. und Alkohol von 95 Vol.-Proz. Zur obigen Angabe Bokorny's,

daß Maltase durch Chloroformwasser nicht geschädigt werde, sei bemerkt, daß nach MORRIS (1) frische, intakte Hefe keine Spaltung der Maltose bewirkt, wohl aber getrocknete. Es ergab sich indessen, daß MORRIS (2) zur Hinderung der Gärung beim Digerieren von Hefe mit Maltose Chloroformwasser angewandt hatte, welches nach EMIL FISCHER (2), sowie nach LINTNER und KRÖBER (1) die Maltase erheblich schädigt, bezw. zerstört. Durch Licht wird nach EMMERLING (1) die Maltase nicht verändert.

Aus allen Versuchen geht hervor, daß die Maltase ein bei weitem empfindlicheres Enzym als die Invertase ist. Von Hefentryptase wird sie anscheinend nicht verändert, denn BAU (4) fand, daß untergärige Hefe UF, welche während 5 Stunden bei 45° verflüssigt war, Maltose ziemlich stark spaltete; dagegen war in Hefenpreßsaft, welcher 8 Tage bei ca. 20° gestanden hatte, und in einer zweiten, drei Wochen alten Probe eines gleichen Preßsaftes Maltase nicht mehr nachzuweisen. Welche Umstände das Verschwinden dieses Enzymes bewirkten, ist nicht weiter untersucht worden; es bietet sich daher für Gärungsphysiologen noch ein ergiebiges Feld, unsere Kenntnisse über die Hefenmaltase zu erweitern.

Die Maltase erregt unser Interesse nun noch in einer besonderen Weise, da sie sich nicht nur als spaltendes, hydrolysierendes Enzym erwiesen hat, sondern auch die Eigenschaft der S y n t h e s e, des Aufbauens, zeigt. C. HILL (1) hatte gefunden, daß in Gegenwart größerer Mengen von Maltose die Spaltung dieses Zuckers unvollständig bleibt, sobald sich die Lösung an Glucose angereichert hat. Seine Maltaselösung stellte HILL in der Weise her, daß er untergärige Bierhefe auf Tontellern trocknete, zerrieb und sie langsam auf 100° erhitzte. Das Pulver wurde mit der zehnfachen Menge schwach sodahaltigen Wassers unter Zusatz von Toluol drei Tage lang digeriert. Das Filtrat spaltete Maltose in zweiproz. Lösung vollständig, in höherer Konzentration aber nicht. Auch Gegenwart von Glucose hinderte die vollständige Hydrolyse der Maltose. Ließ HILL die Maltaselösung auf 40-proz. Glucoselösung einwirken, so trat der Vorgang der **R e v e r s i o n** ein, indem 15 Proz. des Zuckers in ein Disaccharid verwandelt wurden, welches HILL für Maltose hielt. Durch ausführliche, sich über mehrere Monate erstreckende Versuche wies indessen O. EMMERLING (2) nach, daß der durch Reversion gebildete Zucker nicht Maltose sondern Isomaltose ist, und zwar die unvergärbare Isomaltose FISCHER's (3), nicht die Isomaltose C. J. LINTNER's (3); diese beiden Isomaltosen sind grundverschiedene Zuckerarten, welche nur die gleiche empirische Zusammensetzung haben, aus d-Glucose bestehen und das identische Phenylosazon vom Schmelzpunkt 151—153° bilden. Leider kann an dieser Stelle auf die viel umstrittene Frage der Existenzberechtigung der Isomaltose LINTNER's nicht näher eingegangen werden; die Existenz von FISCHER's Isomaltose ist zufolge FISCHER (4) und OST (1) erwiesen. Der Angabe von EMMERLING, daß sich bei der Einwirkung von Hefenmaltase FISCHER's Isomaltose bildet, widersprach HILL (2), doch, nachdem EMMERLING (1) in weiteren Versuchen mittelst Hefenmaltase auch aus Blausäure, Bittermandelöl und d-Glucose Amygdalin rekonstruiert hatte, kam HILL (3) zu der Ueberzeugung, daß neben (FISCHER's) Isomaltose eine andere Zuckerart entstände, welcher er den Namen R e v e r t o s e beilegte. Diese Revertose oder Revertobiose bildet nach der Reinigung kristallinische, stark hygroskopische Krusten, deren Drehungsvermögen etwa $\alpha_D = +91{,}5°$ beträgt,

und deren Reduktionsvermögen nur 47.5 Proz. der Maltose ausmacht. Die Revertose bedarf noch einer weiteren Untersuchung; vielleicht verdankt sie ihre Entstehung der Invertase, welche in dem Hefenauszug ja vorhanden ist. An dieser Stelle ist noch einmal Gewicht darauf zu legen, daß Enzyme nicht nur hydrolysierende, abbauende Eigenschaften besitzen, sondern auch die Synthese von Körpern höheren Molekulargewichtes bewirken können. Die Hefenmaltase steht in dieser Beziehung nicht vereinzelt da; vergl. Bd. I, S. 264—265.

§ 93. Die Melibiase.

Ein Polysaccharid, welches unter den Namen Melitose, Gossypose, Melitriose und Raffinose bekannt ist, und das wir im § 96 näher kennen lernen werden, wird bei der gemäßigten Einwirkung von verdünnten Säuren zu zwei Zuckerarten hydrolysiert, von denen die eine die alt bekannte d-Fructose darstellt, während die andere ein Disaccharid von der Formel $C_{12}H_{22}O_{11}$ ist, welches SCHEIBLER und MITTELMEIER (1) mit dem Namen Melibiose belegten. Auch durch gewisse Hefen wird die Raffinose in diese beiden Zuckerarten gespalten; so fand schon BERTHELOT (2), daß bei der Einwirkung von Hefe auf Melitose ein unvergärbarer Zucker hinterbleibt, welchen er als Eucalyn bezeichnete. Seine späteren Angaben über diese letztere Verbindung sind aber zufolge BAU (6) so widerspruchsvoll, daß sie sich nicht mit Sicherheit für die Melibiose verwerten lassen. In einer weiteren Mitteilung gibt BERTHELOT (3) an, daß die Raffinose (= Melitriose) mit guter Hefe vollständig, mit Bäckerhefe, welche geschwächt sei, nur zu einem Drittel vergärt. Nach RISCHBIET und TOLLENS (1) vergärt die Melitriose leicht und vollständig. LOISEAU (1) macht demgegenüber darauf aufmerksam, daß dieser Zucker durch untergärige Bierhefe vollständig, durch Oberhefe nur zu einem Drittel vergoren wird. SCHEIBLER und MITTELMEIER (2) fanden, daß käufliche Hefe die Melitriose nur zum Teil vergärt, sowie daß im Gärungsrückstande ein amorpher Zucker, nämlich Melibiose, zurückbleibt. Diesen Untersuchungen gegenüber wies BAU (6) nach, daß Reinkulturen untergäriger Hefen die Melitriose vollständig vergären, solche von obergärigen Hefen indessen einen Zucker, eben die Melibiose, abspalten und unverändert lassen. BAU (5 u. 7) gewann dann nach der physiologischen, wie nach der chemischen Methode, auf deren Ausführung im einzelnen auf die Originalabhandlungen hingewiesen werden muß, kristallisierte Melibiose in größerer Menge. Dieses Disaccharid wird, wie TOLLENS und seine Mitarbeiter (1), sowie SCHEIBLER und MITTELMEIER (1) fanden, durch energische Einwirkung von Säuren in die zwei einfachen Zuckerarten d-Glucose und d-Galactose zerlegt. Sie enthält demnach dieselben Komponenten wie der Milchzucker (s. § 94), indessen in anderer chemischer Bindung. Zur Hydrolyse mittelst Säuren sind nach BAU (6 u. 10) nur Mineralsäuren und Oxalsäure tauglich.

Während die Melibiose, ebenso wie der Milchzucker, durch Säuren nur schwierig hydrolysiert wird, spaltet ein Hefenenzym sie sehr leicht. Nachdem BAU (6) im Jahre 1894 die Vermutung ausgesprochen hatte, die Melibiose sei nicht direkt vergärbar, sondern müsse zunächst in ihre Komponenten d-Glucose und d-Galactose gespalten werden, gelang es im folgenden Jahre gleichzeitig E. FISCHER und P. LINDNER (1), sowie

Bau (1), in der untergärigen Bierhefe ein Enzym aufzufinden, welches diese Umwandlung bewirkt, und Bau nannte es Melibiase.

Weil das Vorkommen der Melibiase in manchen Saccharomyceten zu einer wichtigen chemischen Unterscheidung von Hefengruppen dienstbar gemacht werden kann, wollen wir zunächst die allgemeinen Eigenschaften der Melibiase betrachten, da durch deren Erkenntnis der Wert der Diagnostik von Hefenrassen auf Grund der Wirkung dieses Enzymes besser verständlich wird.

Die Melibiase, welche nach E. O. von Lippmann's (1) Vorschlag als Melibio-Glucase zu bezeichnen wäre, ist nach Fischer und Lindner (1), sowie nach Bau (1, 4, 5) in Wasser ziemlich schwer löslich. Die Optimaltemperatur für ihre Wirkung, bei welcher die Melibiose gemäß der bekannten Gleichung $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$ in ein Molekül d-Glucose und ein Molekül d-Galactose zerlegt wird, ist 50° C, doch findet reichliche Spaltung des Disaccharides bereits bei erheblich niedrigerer Temperatur statt. Die Zerstörungstemperatur liegt bei 70°. Indessen verträgt Melibiase sehr gut das Austrocknen, wie schon Fischer und Lindner (1) fanden. Nach Bau (4) kann Unterhefe, die bei 30—37° getrocknet worden war, ohne Schädigung für das Enzym acht Stunden auf 100° oder 5 Stunden auf 110° erhitzt werden; auch bewahrt die so getrocknete Hefe die Enzymkraft über $5^3/_4$ Jahre lang. Die Melibiase erweist sich in dieser Beziehung ebenso widerstandsfähig als die Invertase.

Bei der Anwendung chemischer Agentien wird die Melibiase in der Hefe vernichtet durch Einwirkung von: Oxalsäure in 1-proz. Lösung, Schwefelsäure 1 und 0,5 Proz., Salzsäure 0,91 Proz., Natriumhydroxyd 1 Proz., Silbernitrat 0,1 Proz., Quecksilberchlorid 0,1 und 0,02 Proz. Mehr oder minder stark geschwächt wird sie durch: Essigsäure 1 Proz., Oxalsäure 5,0 Proz., Schwefelsäure 0,2 Proz., kohlensaures Natron (Soda) 1 Proz., Natriumhydroxyd 0,5 Proz., Silbernitrat 0,02 Proz., Alkohol von 95 Vol.-Proz. Eine geringe Schädigung rufen Oxalsäure von 0,2 Proz. und Weinsäure von 4 Proz. hervor.

Gegenüber der Einwirkung anderer Enzyme ist Melibiase fast ebenso widerstandsfähig wie die Invertase. In der von Bau (4) gewählten Versuchsanordnung (vergl. S. 411 u. 414) ergab sich gegenüber dem äußerst resistenten Enzym Invertase nur der Unterschied, daß nach dem Behandeln der Hefe mit Pepsin in den abfiltrierten Hefenzellen sich Melibiase nachweisen ließ, dagegen nicht in der filtrierten Lösung. Etwas empfindlicher als Invertase scheint demnach Melibiase zu sein, doch übertrifft sie in der Widerstandskraft bei weitem die Maltase. Es ist auch möglich, daß in schwach saurer Lösung die Melibiase nicht löslich ist, da das Filtrat von der Pepsinverdauung freie Salzsäure enthielt; fand z. B. doch Hill (1), daß der Extraktion der Maltase ein schwach alkalisches Wasser förderlich sei. Es muß daher weiterer Forschung vorbehalten bleiben, ob die konstatierte Schwerlöslichkeit der Melibiase in Wasser durch vorsichtigen Zusatz kohlensaurer Alkalien behoben werden kann.

Die Melibiase kommt im allgemeinen in sämtlichen untergärigen Bierhefen sowohl vom Frohberg-, wie vom Saaz-Typus vor. Eine Ausnahme bilden nach Lindner die untergärigen Bierhefen *Nr. 2*, *Nr. 18* und *Nr. 389* der Berliner Sammlung, welche Melibiose „so gut wie gar nicht" vergären. Die Unterhefe *Nr. 2*, *Victoria*, vergärt jedoch zufolge Bau (4) Melibiose, wenn auch langsam und träge. Hefe *Nr. 18*

wird, wie einige andere, nicht mehr in der Berliner Sammlung weiter gezüchtet, und ist also gleich diesen aus der wissenschaftlichen Literatur zu streichen, da ein erneutes Auffinden und zumal Identifizieren solcher Hefen sehr schwer möglich ist. Die Unterhefe *Nr. 389, Gräfenthal*, ver-
5 gärt aber Melibiose nicht; sie bildet mit dieser Eigenschaft eine bemerkenswerte Ausnahme von allen untergärigen Betriebshefen, die nach den Untersuchungen BAU's sonst Melibiase enthalten.

Die obergärigen Kulturhefen vergären im allgemeinen Melibiose nicht. LINDNER's Angabe, daß die Preßhefen *Nr. 430*, *Nr. 487* und
10 *Nr. 571* Melibiose spalten sollen, beruht auf einem Irrtum. Dagegen wird Melibiose vergoren von der obergärigen Bierhefe *Liegnitz a Nr. 405* und von der Preßhefe *Winterhude, Rasse III, Nr. 139*. Die Hefen aus Danziger Jopenbier *Nr. 600* und *Nr. 603* vergären Melibiose; die aus Broyhan *Nr. 330*, entgegen LINDNER's Angaben, dagegen nicht. In den
15 Bieren Broyhan und Jopenbier kommen zahlreiche Organismen vor, die eigentlich nicht zu den Kulturhefen zu rechnen sind, es darf daher nicht überraschen, daß sich in diesen Bieren (Jopenbier) auch Pilze vorfinden, welche Melibiose angreifen. Von den echten obergärigen Kulturhefen wird dieser Zucker nur durch die Bierhefe *Liegnitz a Nr. 405*
20 und die Preßhefe *Winterhude, Rasse III, Nr. 139* gespalten.

Untergärige Bierhefen nehmen zuweilen trotz kalt gehaltener Gärführung obergärigen Charakter an. E. Chr. HANSEN (1) beobachtete dies als der erste; vergl. S. 163 u. f. BAU (9) sah die gleichen Erscheinungen zeitweise in Holland auftreten; auch von anderen Seiten
25 wurden gelegentlich hierüber Mitteilungen gebracht. Ausführlich berichtet über diesen Gegenstand W. HENNEBERG (1). Die von ihm untersuchte Unterhefe, welche in auffallender und konstanter Weise obergärige Erscheinungen annahm, vergor Melitriose vollständig, mithin auch die Melibiose, sie hatte demnach die charakteristische Eigenschaft der
30 Unterhefen beibehalten. Es drängt sich hierbei die Frage auf, ob nicht jene Oberhefen, welche Melibiose vergären, ursprünglich Unterhefen waren, welche zuerst spontan obergärigen Charakter annahmen und diesen durch die Kulturbedingungen beibehielten.

Die große Gruppe der Weinhefen, sowie die Milchzucker-
35 hefen vergären Melibiose nicht. LINDNER fand, daß Hefe *Dürkheim Nr. 54* und *Küster Tokayer Nr. 534* Melibiose angreifen. Da diese Hefen aber nicht weiter kultiviert werden und eine Nachprüfung unmöglich ist, sind sie aus der wissenschaftlichen Literatur zu streichen. Alle von SCHUKOW (1), BAU (4 u. 5) und LINDNER (1) untersuchten
40 Rassen, mit den eben erwähnten Ausnahmen, erwiesen sich als frei von Melibiase. KALANTHARIANTZ (1) fand indessen Weinhefen auf, welche Melibiose spalten. Bei einer solchen Rasse aus Bari in Apulien trat deutliche Hydrolysierung der Melibiose ein, wenn die Zuckerlösung mit der Hefe bei 40° digeriert wurde, dagegen blieb die Spaltung des Zuckers
45 aus, wenn die Einwirkung der Hefe auf dieses Kohlenhydrat bei 25—30° stattfand. Ebenso bewirkte Assmannshäuser Hefe bei 25° starke Hydrolysierung der Melibiose. Da nach LINDNER (1) Assmannshäuser Hefe aber ohne Wirkung auf Melibiose ist, dürfte sich eine Nachprüfung der Angaben von KALANTHARIANTZ empfehlen.

50 Von den wilden, botanisch genau definierten Hefen vergären *Sacch. Pastorianus I* und *III* die Melibiose.

Eine eigentümliche Stellung nimmt die Hefe *Logos* (s. S. 174) ein, welche nach BAU (10) und SCHUKOW (1) Melibiose nicht vergärt.

Lindner (1) kam zu einem anderen Ergebnis. Nach den von Bau (4 u. 5) gewonnenen Resultaten existieren von dieser Hefe zwei Rassen, von denen eine die Melibiose vergärt, die andere dagegen nicht. Aehnliche Rassenspaltungen haben wir bei dem *Schizos. octosporus*, bei der *Monilia variabilis* und besonders bei der *Torula colliculosa* (vergl. S. 292).

Fassen wir diese Studien zusammen, so ergibt sich, daß die Kulturunterhefen bis auf eine Ausnahme *Gräfenthal Nr. 389* sämtlich Melibiose vergären, ebenso zwei Kulturoberhefen, die Brauereihefe *Liegnitz a Nr. 405*, die Preßhefe *Winterhude, Rasse III, Nr. 139, Sacch. Pastorianus I* und *III*, zwei Hefen aus Danziger Jopenbier *Nr. 600* und *Nr. 603*, mehrere nicht benannte wilde Hefen und eine Rasse der Hefe *Logos*.

Nach H. Gillot (1) wird Melibiose durch Oberhefen auch dann nicht vergoren, wenn der Hefe zu gleicher Zeit leicht assimilierbare Zuckerarten, wie Traubenzucker usw., dargeboten werden.

Auf die Eigenschaft der Melibiose, nur von Unterhefen vergoren zu werden, gründete Bau (11) ein Verfahren zum Nachweise einer Verfälschung obergäriger Preßhefe durch Unterhefe, welches im 25. Kapitel des Zweiten Bandes näher beschrieben ist.

Auch bei der Dauerhefe Buchner's läßt es sich erkennen, ob sie aus Unterhefe oder Oberhefe oder aus einem Gemisch beider erzeugt wurde. Da die Melibiase das wirksame Agens bei der Unterscheidung von Oberhefe und Unterhefe darstellt, wird zur Feststellung der Gegenwart von Unterhefe der Nachweis dieses Enzyms genügen. Dieser gelingt aber sehr leicht durch Prüfung mittelst Melibiose, welche Zuckerart durch kein anderes Hefenenzym als durch Melibiase in ihre Komponenten d-Glucose und d-Galactose zerlegt wird. Letztere lassen sich leicht mittelst Phenylhydrazin erkennen. Der Versuch wird praktisch wie folgt ausgeführt. Eine einproz. Melibioselösung, welche anderen Zucker nicht enthalten darf, wird mit 2 Proz. (oder etwas mehr) der zu prüfenden Hefe, sowie mit 1 Proz. Toluol versetzt und 1—3 Tage bei ca. 25° C aufbewahrt. Nach der Digestion filtriert man, kocht das Filtrat mit einer geringen Menge guter Tierkohle, filtriert wiederum klar und prüft die Flüssigkeit mit Phenylhydrazin, indem man auf je 1 g angewandter Melibiose 2 g Phenylhydrazin und 2 g 50-proz. Essigsäure zufügt und das Gemisch eine Stunde im kochenden Wasserbad erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird in kaltes Wasser (Verhältnis der ursprünglich angewandten Menge Melibioselösung zu Wasser etwa wie 1 : 3) gegossen, filtriert, der Filterrückstand einmal mit Wasser ausgewaschen und dann in ein Becherglas gespült, in welchem er mit Wasser aufgekocht wird. Löst sich das gebildete Osazon im kochenden Wasser vollständig, so ist Unterhefe nicht zugegen (oder nicht in nachweisbarer Menge), bleibt dagegen Osazon ungelöst, so ist dies ein Beweis für die Gegenwart von Unterhefe, da ja Gluco- und Galactosazon in kochendem Wasser nur schwer löslich sind. Die mikroskopische Untersuchung (Kristallform) gibt außer dem Verhältnis der Löslichkeit in heißem Wasser noch weitere Anhaltspunkte, da das Melibiosazon in feinen, stets sternförmig gruppierten Nädelchen kristallisiert, die beiden Hexosazone dagegen vorwiegend in groben, langen und dicken Nadeln. Dem erfahrenen Analytiker genügt bereits diese Unterscheidung. Wer aber den Charakter der Osazone noch durch Schmelzpunkt und eventuell durch Elementaranalyse bestimmen will, muß einen komplizierten Weg einschlagen; vergl. darüber Bau (10), welcher nach dieser Methode 10 Proz. Unterhefe in obergäriger Dauerhefe mit Sicherheit nachweisen konnte.

§ 94. Die Lactase.

Bei der Besprechung der Alkoholgärung der Milch im 8. Kapitel des Zweiten Bandes sind eine Reihe von Hefen und hefenähnlichen Organismen erwähnt worden, welche den Milchzucker vergären.

Der Milchzucker oder die Lactose ist eine der am ältesten bekannten Zuckerarten; wird er doch schon um das Jahr 1615 von Fabricio Bartoletti beschrieben. Er findet sich in der Milch der Säugetiere; so enthält Kuhmilch 3,6—6,0 Proz., im Mittel etwa 4,5 Proz. an diesem Zucker, Ziegenmilch 3,26—6,65 Proz., Schafmilch 3,43—6,62 Proz., die Milch der Pferde 4,72—7,32 Proz. und die Milch der Eselstuten 5,29—7,63 Proz.

Kocht man Milchzucker mit verdünnten Mineralsäuren, so wird er in je ein Molekül d-Glucose und d-Galactose gespalten, jedoch vollzieht sich diese Hydrolyse nur äußerst langsam und schwierig. Die Hydratation erfolgt nach Ost (2) nur dann vollständig, wenn man einen Teil Milchzucker mit vier Teilen einer zweiproz. Schwefelsäure sechs Stunden lang, oder mit zehn Teilen derselben Säure vier Stunden lang kocht. Nach Urech (1) verändert sich eine Lactoselösung, welche 11,38 Proz. Salzsäure enthält, in der Kälte selbst bei 28-tägigem Stehen gar nicht, erst bei einem Gehalt von 32 Proz. Salzsäure wird der Zucker bei 23° innerhalb 12 Stunden fast vollständig gespalten. Eine Milchzuckerlösung mit einem Gehalt von 4 Proz. Oxalsäure bleibt auch nach achtstündigem Kochen unverändert, und ebensowenig läßt sich zufolge der Untersuchungen von Jones (1) die Lactose durch Citronensäure hydrolysieren. Es erscheint demnach ausgeschlossen, daß in einer Milchzucker enthaltenden Flüssigkeit allein durch säurebildende Bakterien die Lactose durch die entstandene organische Säure gespalten werde.

Der Milchzucker unterliegt direkt, wie alle Di- und Polysaccharide, der Alkoholgärung nicht, er muß vielmehr vorher durch ein besonderes Enzym, die Lactase, in seine Komponenten d-Glucose und d-Galactose zerlegt werden.

Wie im § 35 des Zweiten Bandes bereits erwähnt wurde, hatte Beijerinck dieses Enzym, welches nach E. O. von Lippmann (1) auch Lacto-Glucase genannt wird, in *Sacch. Kefyr* und *Sacch. tyrocola* aufgefunden. Nach E. Fischer (5) läßt sich die Lactase aus der Milchzuckerhefe nicht unmittelbar mit Wasser ausziehen, vielmehr muß man die Zellen vorher mit Glaspulver zerreiben, um das Enzym in Lösung zu bringen. Auch durch Chloroform abgetötete Milchzuckerhefe wirkt energisch hydrolysierend auf eine Lactoselösung ein. Aus Kefirkörnern geht dagegen dieses Enzym mit Wasser leicht in Lösung; E. Fischer nennt es deshalb zum Unterschiede von der Hefenlactase Kefirlactase. Letztere zeigt gegenüber konzentriertem Alkohol eine größere Beständigkeit als die Maltase.

Buchner und Meisenheimer (1) gewannen aus einer armenischen Mazunhefe einen Preßsaft, welcher eine Lactase enthält. Diese Hefenlactase diffundiert nicht durch Pergamentpapier und ist somit ebenso wie das Enzym aus *Monilia candida* (s. S. 336) ein Endoenzym.

Des Vorkommens von Lactase ist schon im 8. Kapitel des Zweiten Bandes ausführlich gedacht worden. Alle Organismen, welche Milchzucker vergären oder, wie einige Bakterien, in d-Glucose und d-Galactose spalten, müssen dieses Enzym besitzen.

Von Schimmelpilzen enthält voraussichtlich *Mucor javanicus* nach WEHMER (1) und *M. Cambodja* nach CHRZASZCZ (1), ebenso *Allescheria (Eurotiopsis) Gayoni* nach LABORDE (1) dieses Enzym. Auch das entwickelte Mycel von *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* scheint, wie DUCLAUX (2) fand, Lactase auszuscheiden, doch bedarf diese Frage 5 noch eines weiteren Studiums; man vergl. S. 250.

Das Emulsin, welches jedenfalls ein Gemisch mehrerer Enzyme ist, spaltet nach E. FISCHER (5) gleichfalls die Lactose. Auch ein Enzym der Gerste weist nach BEIJERINCK (2) und BERNHEIM (1) die Eigenschaft auf, den Milchzucker zu hydrolysieren. 10

Im Tierreich ist Lactase weit verbreitet; so hat sie KOBERT (1) in den Säften zahlreicher niederer Tiere aufgefunden. Sie kommt in der Magen- und Darmschleimhaut menschlicher Säuglinge und junger Tiere nach PAUTZ und VOGEL (1), WEINLAND (1), FISCHER und NIEBEL (1) und anderen Forschern vor. 15

Die von STOKLASA und CZERNY (2) aus Muskelsubstanz, Leber, Lunge und anderen Organen gewonnenen Preßsäfte spalten und vergären den Milchzucker; auch der Preßsaft des Pankreas enthält zufolge der Untersuchungen von SIMÁČEK (1) Lactase.

Die Optimaltemperatur der Lactase scheint nach WEINLAND bei 39° 20 zu liegen, doch sind hierüber, wie auch über die Zerstörungstemperatur, über begünstigende oder schädigende Beeinflussung des Enzymes durch chemische Stoffe usw. umfassende Studien nötig; denn diese Eigenschaften der Lactase sind bisher ganz unbekannt.

Wie die Maltase (s. S. 415) zeigt auch die Lactase, und zwar zu- 25 nächst die Kefirlactase, die bemerkenswerte Eigenschaft der Reversion. Versetzt man 200 ccm eines Auszuges von Kefirkörnern mit 100 Gramm d-Glucose und 100 Gramm d-Galactose, sowie mit 10 ccm Toluol und bewahrt den gut verschlossenen Kolben 15 Tage bei 35° auf, so läßt sich aus dem Gemisch nach E. FISCHER und ARMSTRONG (1) ein 30 neuer Zucker, ein Disaccharid, gewinnen, welchem die Forscher den Namen Isolactose beilegen. Diese wird in verdünnter Lösung von Kefirlactase wieder in d-Glucose und d-Galactose gespalten, dagegen von Emulsin nicht hydrolysiert. Hochinteressant ist die Beobachtung E. FISCHER's und ARMSTRONG's, daß Isolactose von Unterhefe vergoren wird, 35 dagegen nicht von Oberhefe. Sie zeigt gegenüber diesen beiden Hefenrassen mithin genau das gleiche Verhalten wie die Melibiose.

§ 95. Die Trehalase.

Die Zuckerart Trehalose (s. Bd. I, S. 280) besteht aus zwei Molekülen d-Glucose, die aber unter sich in anderer Weise gebunden sind 40 als die beiden Gruppen Traubenzucker, welche die Maltose (s. S. 412), die Isomaltose, die Turanose und wahrscheinlich noch andere Disaccharide, so die Revertose von C. HILL (1), zusammensetzen. Sie wird nur sehr schwierig durch Säuren hydrolysiert: erst nach sechsstündigem Kochen mit 5-proz. Schwefelsäure werden über 99 Proz. der Trehalose gespalten. 45

Früher nahm man an, diese Zuckerart sei unvergärbar, bis BÖNING nachwies, daß dieselbe „mit bester, genügend ausgewaschener Hefe“ nach 12 Stunden in Gärung gerät“; vergl. TOLLENS (2).

BOURQUELOT (1) hatte dann im *Aspergillus niger* (s. S. 249) ein

Enzym aufgefunden, welches Trehalose spaltet. Zur Darstellung dieser Trehalase, die nach E. O. von Lippmann (1) Trehalo-Glucase zu nennen wäre, züchtet der erstgenannte Forscher den Schimmelpilz auf Raulin'scher Flüssigkeit, zerreibt die Kultur mit Sand, entwässert den Brei mit 95-proz. 5 Alkohol und trocknet ihn im Vakuum. Darauf wird er mit Wasser ausgezogen und das Filtrat mit Alkohol gefällt. Die so dargestellte Schimmelpilz-Trehalase, die auch in *Penicillium*-Arten (s. S. 250) vorkommt, hat die Zerstörungstemperatur von 63°. Es ist aber fraglich, ob die Trehalose spaltenden Enzyme, welche in Hefen vor-10 kommen, mit dieser Schimmelpilz-Trehalase identisch sind.

Außer in Schimmelpilzen fand Bourquelot Trehalase in der Gerste und im Grünfutter auf und knüpft hieran die Bemerkung, daß der, auch von E. Fischer (2) in diesen Rohstoffen nachgewiesene Enzymgehalt von den sich stets vorfindenden Schimmelpilzen herrührt (vergl. 15 auch S. 414). Der französische Forscher geht sogar noch weiter, indem er die Vermutung ausspricht, daß Trehalose vielleicht nur dann von Hefen vergoren wird, wenn diese in nicht sterilisierten Malzwürzen herangezüchtet worden waren und somit aus dem Rohmaterial einen Gehalt an Trehalase mitbrachten.

20 Nach E. Fischer (2) hydrolysiert aber auch Reinhefe selbst die Trehalose, jedoch nicht Invertin und filtrierte Hefenauszüge. Es studierte dann A. Kalanthariantz (1) das Verhalten verschiedener Hefenenzyme zur Trehalose. Einige Weinhefen hydrolysierten bei 22—28° C 10 bis 21,5 Proz. der Trehalose, untergärige Bierhefen (bei 24° C) 10—37,5 Proz., 25 obergärige, so Weißbier- und Lichtenhainer-Hefe, 5—10 Proz., verschiedene andere Arten 7,5—25 Proz., die Hefe Kißly-Schtschi 0 und 20 Proz., *Logos* einmal 0 und einmal 25 Proz., *Pombe* zweimal 0 und einmal 5 Proz. Es fällt hier, besonders unter den zuletzt genannten Hefen, ein ganz unregelmäßiger Verlauf der Hydrolysierung auf. Nach Delbrück (1) läßt 30 sich Trehalase in vielen Wein-, Bier- und Preßhefen nachweisen.

Die Versuche von Bau (12) ergaben über die Gegenwart eines spezifischen, Trehalose spaltenden Enzymes in untergäriger Hefe kein sicheres Resultat. Sie wurden bei der Gärtemperatur von 25—30° C angestellt und auf vier Monate ausgedehnt und ergaben zunächst, daß die Gärung 35 bei den meisten untersuchten Organismen — wenn solche stattfand — langsam eintrat und schleppend zu Ende geführt wurde. Im Laufe der Zeit wurde die Trehalose vergoren: durch die Hefen US, UF, OS, Hefe *Logos*, *Sacch. ellipsoideus II*, *Sacch. Pastorianus I, II, III*, sowie *Monilia candida*, während eine Lactose spaltende Hefe eine nicht nennenswerte, 40 *Schizos. Pombe* und *Sacch. apiculatus* kaum oder wahrscheinlich nicht eine Veränderung der Trehalose hervorriefen.

Nach Kayser (1) vergärt die Ananashefe (s. S. 291) Trehalose, nach Went (1) die *Monilia sitophila*, nach Laborde (1) die *Allescheria (Eurotiopsis) Gayoni*, nach Rommel und Sitnikoff (1) der sogen. *Amylomyces α* 45 und der *Amylomyces γ* (s. d. 22. Kap.).

Nach Lindner (1) wird Trehalose vergoren: durch eine Hefe aus Kißly-Schtschi, von *Monilia candida* und *M. variabilis*, von *Mucor Rouxii*, *Amylomyces γ*, von der Hefe *Nr. 602* aus Danziger Jopenbier, einer Rasse *(Nr. 402)* des *Sacch. anomalus*, von fast allen zu diesen Versuchen verwandten 50 Weinhefen, *Sacch. Pastorianus I, II, III*, *Sacch. ellipsoideus I* und *II*, *Sacch. cratericus*, zwei Hefen aus Breslauer Kretschmerbier, ferner von untergärigen Kulturhefen die Rasse *Frohberg*, während über Hefe *Saaz* kein sicheres Resultat erlangt wurde. Von den weiteren untersuchten Rassen

des Typus UF vergoren 24 die Trehalose, 9 dagegen nicht oder mit zweifelhaftem Ergebnis. In der überwiegenden Anzahl riefen die Kulturoberhefen eine Vergärung dieses Zuckers hervor, nur etwas über 16 Proz. derselben waren ohne Wirkung auf die Trehalose; in gleicher Weise verhielt sich die Mehrzahl der wilden Hefen, da von 37 Rassen nur 5 den Zucker unberührt ließen. Gegenüber der Angabe von BAU, daß Hefe *Logos* Trehalose vergärt, kam LINDNER zu einem abweichenden Resultat. Bei drei Milchzuckerhefen fand KALANTHARIANTZ eine Spaltung der Trehalose auf, während LINDNER (1) mit den gleichen Hefen eine Vergärung dieses Zuckers nicht erzielen konnte.

Wir können uns somit nicht verhehlen, daß unsere Kenntnis einer in den Hefen vorkommenden Trehalase keineswegs sicher gefestigt ist. BAU (12) wies darauf hin, daß im allgemeinen die Vergärung von Trehalose einige Aehnlichkeit mit dem Gärverlauf von *Monilia candida* in Rohrzuckerlösung hat, nur ist die Gärung noch träger.

Während es unzweifelhaft feststeht, daß einige Schimmelpilze nach den Versuchen BOURQUELOT's ein Trehalose spaltendes Enzym, die Trehalase, enthalten, erscheint es nicht angebracht, ein solches für die echten Hefen — soweit sie vorläufig untersucht sind — anzunehmen. Hiergegen spricht zu sehr die Unregelmäßigkeit der Spaltung, wie der äußerst langsame Gärverlauf. Es wird hier wohl das gleiche der Fall sein wie bei dem Verhalten von *Monilia candida* gegenüber Rohrzucker. Vielleicht werden auch hier Versuche mit Hefenpreßsaft zu einem unzweideutigen Ergebnis führen.

§ 96. Die Raffinase.

In der Eucalyptus-Manna hatte MUDIE (1) einen Zucker aufgefunden, den BERTHELOT (1) später untersuchte und mit dem Namen Melitose belegte. Wir haben diesen Zucker bereits auf S. 416 erwähnt. Nachdem schon DUBRUNFAUT im Jahre 1850 die Beobachtung gemacht hatte, daß manche aus Rübenmelasse abgeschiedenen Zuckersorten eine Polarisation von über 100° (im Apparate von SOLEIL-VENTZKE-SCHEIBLER) zeigten, führte SCHEIBLER anfangs diesen Umstand auf eine Beimengung von Dextrin zurück. Diese Annahme erwies sich jedoch als nicht stichhaltig, und man belegte den Bestandteil des Rübenzuckers, welcher die höhere Polarisation verursachte, mit dem Namen Pluszucker. LOISEAU gelang es im Jahre 1876, diesen Zucker in reinem Zustand zu gewinnen; er nannte ihn Raffinose, weil er ihn aus den Rückständen der Zuckerraffinerien zuerst gewonnen hatte. Durch ausführliche spätere Arbeiten von TOLLENS und seinen Mitarbeitern, sowie durch die gleichzeitigen Studien von SCHEIBLER und MITTELMEIER wurde dann dargelegt, daß die Zuckerarten Melitose, Raffinose, Pluszucker und Gossypose identisch sind. Die Literatur über diese hochinteressanten Arbeiten, deren Originalstudium allen jüngeren Forschern empfohlen werden kann, welche sich mit der Erkennung von Zuckerarten vertraut machen wollen, ist bei BAU (6) und bei E. O. VON LIPPMANN (2) verzeichnet.

Die Raffinose ist ein Trisaccharid, d. h. sie besteht aus drei einfachen Zuckern der C_6-Gruppe und zwar der d-Fructose, der d-Glucose und der d-Galactose. Diese beiden letzteren sind fester miteinander verbunden — sie stellen die Melibiose (s. S. 416) dar — als unter sich mit der d-Fructose. Letztere ist aus dem Zuckerkomplex leicht abspaltbar; so

rufen verdünnte Säuren, bereits schwache Essigsäure, eine Hydrolyse in dem Sinne hervor, daß das Trisaccharid in d-Fructose und Melibiose gespalten wird, gemäß der Gleichung

$$C_{18}H_{32}O_{16} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_{12}H_{22}O_{11}.$$

Die quantitative Bestimmung der Raffinose neben Rohrzucker behandeln mehrere Vorschriften, welche in den Handbüchern über Zuckeruntersuchung niedergelegt sind; ein gärungsphysiologisches Verfahren, welches Raffinose auch in Gemischen mit anderen Zuckern zu entdecken gestattet, wandte Bau (6 u. 11) an. Es gelang ihm, auch in Rübenzuckermelasse die Raffinose nach der Gärungsmethode zu bestimmen, doch erfordert die Untersuchung so viel Zeit, daß sie nur für wissenschaftliche Bestrebungen, nicht aber für praktische, in der Zuckerindustrie herrschende Verhältnisse in Frage kommen dürfte.

Die Raffinose wird von der größten Anzahl der Hefen in Gärung versetzt, welche auch den Rohrzucker (s. § 91) vergären. Die Vergärung dieses Trisaccharides ist teilweise vollständig, wie durch Unterhefen, teils wird es nur zu etwa einem Drittel vergoren, und zwar durch die meisten Oberhefen und durch einige andere Hefen, indem hierbei ein Spaltungsprodukt, die Melibiose, zurückbleibt. Man vergleiche S. 416.

Man nahm nun an, daß die Raffinose durch ein besonderes Hefenenzym gespalten werden müsse, bevor sie der Gärung zugängig wird. Bau (13) trat dieser Auffassung entgegen, indem er ausführte, daß die Bindung der d-Fructose einerseits zu der d-Glucose im Rohrzucker, wie andrerseits zu der Melibiose in der Raffinose identisch sind, wie es sich auch aus den Formelbildern ergibt.

Für die Raffinose gilt die Formel I, für Rohrzucker die Formel II.

```
                  I.                                          II.
                               O
   CH2OH       CH ———————————/   \    CH2OH          CH ———— O ——  CH2OH
     |        / |                 \    |            / |           \  |
   CHOH      /  (CHOH)2            \   C           /  (CHOH)2      / C
     |      O   |                  /   |          O   |           O  |
    CH       \  CH                /   (CHOH)2      \  CH          \ (CHOH)2
   / |          |                O     |               |            \ |
  O  (CHOH)2    CHOH              \    CH              CHOH           CH
   \ |          |                      |               |              |
    CH          CH2                    CH2OH           CH2OH          CH2OH
      \___ O ___/
```

Die in den Formelbildern rechts stehende Fructosegruppe ist in gleicher Weise einmal an die Melibiosegruppe, ein andermal an den Glucoserest gebunden, so daß die in den Formeln durch Fettdruck gekennzeichnete Sauerstoffbindung in beiden Fällen sehr wohl durch die Invertase gelöst werden könnte.

Lindner (1) hob aber hervor, daß es Hefen gibt, welche Rohrzucker nicht vergären, wohl aber die Raffinose, so daß die Existenz einer Raffinase nicht von der Hand zu weisen ist. Als Beispiel sei hier der *Schizosaccharomyces octosporus* erwähnt, welcher zufolge E. Fischer und Lindner (2) Raffinase enthält, dagegen keine Invertase. Demgegenüber vergären Lindner's Kahmhefen *Nr. 170* und *Nr. 178* Rohrzucker, während sie Raffinose intakt lassen. Bei tierischem Invertin fanden Pautz und Vogel (1), sowie E. Fischer und Niebel (1), daß das Enzym aus der

Darmschleimhaut des Hundes sowie des Pferdes wohl Rohrzucker spaltet, dagegen Raffinose unverändert läßt.

Auf Grund dieser Angaben ist die Existenz einer Raffinase als erwiesen anzunehmen, nur wissen wir von ihr, mit Ausnahme der Tatsache, daß sie Raffinose in d-Fructose und Melibiose spaltet, nicht mehr, als daß sie, zufolge einer gelegentlichen Bemerkung von Bau, bei 75° zerstört wird und auch in dem Invertin von Merck enthalten ist.

Außer in Hefen kommt nach Gillot (2) Raffinase auch in Schimmelpilzen vor.

Bei Polysacchariden wirken nach Bourquelot (2) die Enzyme nacheinander, so daß in unserem Beispiel die Raffinose zunächst durch die Raffinase hydrolysiert werden muß, bevor auf die abgespaltene Melibiose die Melibiase einwirken kann. Eine Umkehrung der Wirkung hat nicht statt; so vermag die Melibiase die Raffinose selbst nicht anzugreifen. —

Außer der Raffinase, welche wohl ein ausführlicheres Studium verdiente, gibt es gewiß auch andere Enzyme, welche höhere Zuckerarten, Polysaccharide, spalten. Weil von diesen Enzymen noch weniger Eigenschaften als von der Raffinase bekannt sind, können wir ihnen einen eigenen Paragraphen nicht einräumen, sondern erwähnen sie kurz im Anschluß an die Raffinase.

So ist es zweifelhaft, ob das Manna-Trisaccharid, welches Tanret (1) in der Eschenmanna auffand, der Hydrolyse durch Hefe teilweise oder vollständig, oder eventuell gar nicht unterliegt.

Die Angaben über die Vergärung der Melecitose durch Hefen bedürfen ebenfalls einer Berichtigung. Nach Bourquelot und Hérissey (1) wird dieser Zucker durch ein Enzym des *Aspergillus niger* in Glucose und Turanose gespalten. Diese letztere Zuckerart, eine Biose, aus zwei d-Glucose-Gruppen zusammengesetzt, entsteht auch durch Säurehydrolyse aus der Melecitose.

Die Gentianose wird nach Bourquelot (3) nur zu einem Drittel durch Hefe vergoren, welch letztere die d-Fructose abspaltet und vergärt, die Gentiobiose dagegen zurückläßt. Die Gentiobiose kann aber unter der Einwirkung eines Enzymes des *Aspergillus niger* und durch Emulsin eine weitere Hydrolyse in zwei Moleküle d-Glucose erfahren.

Ein Tetrasaccharid, die Stachyose, welche besonders Tanret (1) und Ad. von Planta und E. Schulze (1) studierten, wird durch Hefe ebenfalls nur teilweise vergoren, indem zunächst d-Fructose abgespalten und vergoren wird, während ein Trisaccharid zurückbleibt. Ob das letztere, welches Mannotriose genannt wird, weiter von Hefe angegriffen werden kann, ist noch nicht ganz sicher gestellt. Emulsin, Diastase und *Aspergillus niger* wirken auf die Stachyose ebenso wie ein Enzym der Hefe.

Ueber die näheren Eigenschaften dieser, die letztgenannten Polysaccharide spaltenden Enzyme wissen wir so gut wie nichts. Es wäre daher eine dankbare Aufgabe, diese Enzyme näher zu studieren, jedoch steht dem einigermaßen die schwierige Beschaffung der höheren Polysaccharide im Wege.

§ 97. Dextrinvergärung durch Hefen (Amylase).

Bereits im Jahre 1833 hatten Biot und Persoz (1) sich dahin ausgesprochen, Dextrin werde von Hefen vergoren, doch gelangte der eine dieser Forscher, Persoz (1), in Gemeinschaft mit Payen im folgenden

Jahre zu dem Schluß, Dextrin sei unvergärbar. Dieser Ansicht schloß sich auch G. Varry (1) an, während Barfoed (1) wieder zu einem entgegengesetzten Resultate kam.

Bei ihren Untersuchungen über den Abbau der Stärke durch Diastase fanden Brown und Morris (2), daß Dextrine durch Hefen nicht direkt vergärbar sind, sondern vorher hydrolysiert werden müssen. Unter gewissen Bedingungen sind einige Unterhefen, die sie als *Sacch. ellipticus* und *Sacch. pastorianus* bezeichneten und welche in den englischen obergärigen Brauereien als sekundäre Gärerreger wirken, fähig, Dextrin zu hydrolysieren und so den Anstoß zu einer direkten Vergärung dieses Körpers zu geben. Nach E. R. Moritz (1) werden Maltodextrine während der Hauptgärung nicht vergoren, vielmehr bilden sie das Material für die Nachgärung.

Zufolge der Anschauung der englischen Chemiker wird das Stärkemolekül unter dem Einfluß der Diastase so abgebaut, daß eine Reihe von Dextrinen, sogen. Amyloinen, entstehen, welche Zwischenstufen zwischen der löslichen Stärke und der Maltose darstellen. Diese Amyloine, welche zeitweise von deutschen Forschern auch Maltodextrine genannt wurden, sind nach der Hypothese von Brown und Morris (3) in der Weise zusammengesetzt, daß auf *n* Moleküle Dextrin $C_{12}H_{20}O_{10}$ *m* Moleküle Maltose $C_{12}H_{22}O_{11}$ treffen, und zwar so, daß bei den Amyloinen von niedrigem Typus, die aus der Stärke weiter abgebaut sind, *m* bei weitem größer ist als *n*, während das Umgekehrte bei jenen Amyloinen der Fall ist, welche in ihrer Zusammensetzung der Stärke näher stehen. Diese geistvolle Hypothese hat aber einer weiteren theoretischen, wie praktischen Untersuchung nicht standgehalten; wir erwähnen nur die Arbeiten C. J. Lintner's, der in zahlreichen Publikationen zu anderen Resultaten gelangte. In einer ihrer Arbeiten kommen Lintner und Düll (1) zu dem Ergebnis, daß als erstes Spaltungsprodukt der Stärke Amylodextrin auftritt, welches durch die Diastase zu Erythrodextrin abgebaut wird. Dieses letztere erleidet unter dem Einfluß des Malzenzymes eine weitere Hydrolyse, es entsteht Achroodextrin; aus diesem bildet sich Isomaltose (Lintner's, die nicht mit Fischer's Isomaltose, einer wohlcharakterisierten synthetisch gewonnenen unvergärbaren Zuckerart, zu verwechseln ist; s. S. 415) und Maltose. Andere Forscher, sowohl Vorgänger wie auch spätere Autoren, kamen zu abweichenden Resultaten. Jeder, der sich mit der schon seit über 100 Jahren spielenden Frage des Abbaues der Stärke durch Diastase befaßte, gelangte zu anderen Ergebnissen, so daß auch die schon verhältnismäßig festgelegten Begriffe Amylodextrin und Erythrodextrin, besonders aber Achroodextrin I, II, III, Maltodextrin usw. im Sinne eines jeden Autors andere Körper darstellen, als bei einem zweiten oder dritten Forscher, der die gleichen Verbindungen unter den Händen zu haben glaubte. In dieser Beziehung, zumal auch in der Namengebung herrscht auf diesem Gebiete eine fast heillose Verwirrung, die wohl darin begründet ist, daß unsere chemischen und physikalischen Hilfsmittel noch nicht ausreichen, die einzelnen Umwandlungsprodukte als wohlcharakterisierte Individuen zu fassen. Vielleicht ist die umfassende Arbeit von Moreau (1) geeignet, hierin endgültige Klarheit zu schaffen. Die einzelnen Hypothesen, welche die Zwischenkörper zwischen Stärke und Maltose behandeln, auch nur in kurzer historischer Weise anzuführen, würde zu weitläufig sein. Wir müssen uns in dem vorliegenden Paragraphen darauf beschränken, als Dextrin Zwischenkörper zwischen Stärke und Maltose aufzufassen, die

von den einzelnen Autoren als Amylo-, Erythro-, Achroodextrine, als Maltodextrine und Amyloine bezeichnet wurden; es wird hier auch nicht ein Unterschied zwischen den durch Diastase erzeugten Dextrinen und solchen, welche durch Säurewirkung auf Stärke aus dieser gewonnen wurden, gemacht werden.

Die Amyloine bewirken nach der Ansicht der englischen Chemiker die Nachgärung des Bieres auf dem Lagerfaß, wie auch E. R. Moritz (1) angibt. Wird das Bier mit einem Gehalt an Amyloinen von niedrigerem Typus (s. oben) geschlaucht, so verläuft die Nachgärung stürmischer, das Bier wird schneller reif. Die echten Saccharomyceten bewirken aber auch nach Moritz nicht die Nachgärung, sondern die Nachgärungshefen, zu denen Brown und Morris wilde Hefen rechnen. Diese Anschauung brachte es mit sich, daß man in England bei der Erzeugung obergäriger Biere der Einführung der Hansen'schen Hefereinzucht skeptisch gegenüberstand; vergl. Bd. V, S. 83. Die Amyloine von höherem Typus, welche Dextrine sich also in ihrer Zusammensetzung der Stärke nähern, bewirken nach Moritz eine allmählich verlaufende Nachgärung, so daß das Bier längere Zeit zum Reifen braucht.

Zu einem ganz anderen Arbeitsgebiet über die Vergärbarkeit der Dextrine wurden Medicus und Immerheiser (1) geführt, als sie einen verdächtigen Wein auf Zusatz von unreinem Stärkezucker prüften. Zu ihren Versuchen über die Dextrinvergärung durch Hefen wandten sie teilweise unreinen Stärkezucker an, teils stellten sie aus diesem das sogen. Dextrin dar und überließen dies der Einwirkung von käuflicher, aber stärkefreier Preßhefe. Die Forscher lösten z. B. 40 g Stärkezucker unter Beigabe von Nährsalzen in 250 ccm Wasser, vergoren die Glucose und erhielten eine auf das ursprüngliche Volumen korrigierte Lösung, welche beim ersten Versuche + 7,65°, beim zweiten + 6,90° polarisierte. Die filtrierte Lösung wurde mit 5 g Preßhefe versetzt; die Polarisation sank nach 6 Tagen auf + 3,35 bezw. + 2,75°. Nachdem dieselbe Lösung bei 30° fünf weitere Tage gehalten wurde, ging die Polarisation in beiden Proben auf + 1,9° zurück und verminderte sich nachträglich bei erneuter Hefengabe. In anderen Versuchen brachten Medicus und Immerheiser die rechtsdrehenden Substanzen vollständig zum Verschwinden; jedoch ist von einer eigentlichen Vergärung des Dextrins nach unseren Begriffen nicht zu sprechen, da weder Kohlensäureentwicklung noch Alkoholbildung verfolgt wurde.

Auch Ed. von Raumer (1) hatte bei Gelegenheit von Untersuchungen einiger Honigsorten, welche auf einen Zusatz von Stärkezucker geprüft werden sollten, Proben angestellt, inwieweit die Dextrine durch Hefen vergoren werden. Er kam zu dem Resultat, daß sich Preßhefe, Bierhefe und Weinhefe verschieden verhalten, indem die erstere Dextrine stark angreift, die letztere dagegen nicht.

Fresenius (1) konnte die Angaben von Medicus und Immerheiser bestätigen. Die sogen. unvergärbaren rechtsdrehenden Stoffe sind auch nach seinen Untersuchungen durch Preßhefe vergärbar, sie werden indessen nicht durch Bierhefe angegriffen. Fresenius machte aber noch auf den Umstand aufmerksam, daß Kahmhefen, oder wie Fresenius sagt, Kahnhefen, Dextrine zum Verschwinden bringen.

Für den Analytiker, welcher Honig oder Wein auf einen Zusatz von Stärkezucker untersuchen soll, ist es deshalb wichtig, zu wissen, daß er niemals die Preßhefe des Handels anwenden darf. Die „Vereinbarungen“ (2) schreiben vor, daß 25 g Honig in 200 ccm einer Nähr-

salzlösung gelöst und sterilisiert, nach dem Erkalten mit 5 ccm dünnflüssiger gärkräftiger, am besten reingezüchteter Weinhefe, nicht Preßhefe, versetzt und bei 20—25° vergoren werden. Die Flüssigkeit wird sodann auf 250 ccm mit Wasser aufgefüllt, nachdem vorher als Klärmittel Tonerde oder 3 ccm Bleiessig und 2 ccm Natriumsulfatlösung zugefügt worden waren, und bei 20° polarisiert. Zeigt der Gärungsrückstand eine erhebliche Rechtsdrehung, so ist er durch Alkoholfällung auf Dextrin zu prüfen.

Bei der Untersuchung des Weines auf Gegenwart von unreinem Stärkezucker soll man K. Windisch (1) zufolge 210 ccm Wein auf ein Drittel eindampfen, dann mit soviel Wasser versetzen, daß die verdünnte Flüssigkeit nicht mehr als 15 Proz. Zucker enthält. Diese Lösung wird mit etwa 5 g gärkräftiger Bierhefe, welche optisch aktive Bestandteile nicht enthält, versetzt und bei 20—25° vollständig vergoren. Der Gärungsrückstand wird nach einem besonderen, durch K. Windisch (1) angegebenen Verfahren weiter auf Dextrin geprüft.

Gegen die Angaben von Medicus, Fresenius u. a. wandte sich nun Lintner (5), indem er ausführte, daß die früher angestellten Versuche sämtlich nicht beweiskräftig sind, da sie einesteils mit unreinem Dextrin, anderenteils mit unreiner Hefe angestellt worden waren. Die Dextrine des Stärkezuckers sind zum Teil Reversionsprodukte, zu denen u. a. das Gallisin von Scheibler und Mittelmeier (3) gehört, und die Preßhefe besteht nicht aus einheitlichen Organismen, sie enthält vielmehr viel Bakterien, welche Dextrin angreifen können. Malzdextrin ist unvergärbar durch reine Hefe vom Typus *Sacch. cerevisiae*; die vielfach sich widersprechenden Angaben lassen sich auch so erklären, daß die einzelnen Autoren teilweise nicht reine, sondern noch zuckerhaltige Dextrine in den Händen hatten. Wenn Ed. von Raumer einen Unterschied in den Hefen in der Hinsicht findet, daß Preßhefe das Dextrin am stärksten, Bierhefe in mittlerem Grade und Weinhefe es gar nicht angreift, so dürfen wir es wohl als sicher gelten lassen, daß seine Preßhefe sehr viele Bakterien, die Bierhefe vielleicht viel Kahmhefe enthielt, während seine Weinhefe verhältnismäßig rein war. Auch nach Schifferer (1) sind die Malzdextrine gegen reine Oberhefe widerstandsfähig, während diese Körper bei Behandlung mit unreiner, käuflicher Preßhefe verschwinden.

In ein neues Stadium gelangten unsere Kenntnisse über die Dextrinvergärung, als man bei dem Studium der Hefen, zunächst der Gruppe *Sacch. cerevisiae*, bestimmte Hefentypen aufstellte. Den Anlaß hierzu gab die Auffindung der Hefe *Saaz* (s. S. 174). Man unterschied die **Hefentypen** Saaz und Frohberg, von denen der erstere einen niedrigeren Endvergärungsgrad erzeugt als der letztere. Da auch obergärige und untergärige Hefen wohl unterschiedene Rassen bilden, erhalten wir die Hefentypen: Untergärig Frohberg, untergärig Saaz, obergärig Frohberg und obergärig Saaz, oder in Zeichen ausgedrückt: UF, US, OF, OS. Hefen vom Typus OF und UF erzeugen in Bierwürzen den gleichen Endvergärungsgrad, ebenso OS und US. Unbedeutende Schwankungen treten in dem Endvergärungsgrad allerdings auf; denn die Hefen vergären ja nicht allein Kohlenhydrate, sondern sie assimilieren und verändern noch zahlreiche andere Würzebestandteile, insbesondere Stickstoffverbindungen und Salze, auch erzeugen sie nichtflüchtige Produkte, zumal Glycerin und Bernsteinsäure (s. S. 378), in wechselnder Weise. Hieraus erklärt es sich, daß der Extraktrest einer und der-

selben Würze, welche durch verschiedene Hefen z. B. vom Typus UF vergoren wurde, nicht in allen Fällen identisch ist, sondern häufig kleinere Differenzen aufweist. Man vergl. auch Bd. V, S. 149.

H. van Laer (1) stellte außer diesen Hefentypen noch den Typus Burton auf, welcher die Würze weiter als die Hefen UF vergärt. Er unterschied außerdem Zwischentypen, welche in ihrem Vergärungsgrad die Mitte zwischen den schon genannten Typen halten sollten, so Saaz-Frohberg und Frohberg-Burton. Diese letzteren Typen haben aber nie das Bürgerrecht in der Gärungsphysiologie erlangt, vielmehr gab sie H. van Laer (2) zum Teil selbst auf, als er die Hefe *Logos* entdeckte. Er unterscheidet nunmehr die Typen S, F und Logos, sowie die später nicht mehr anerkannten Zwischentypen Saaz-Frohberg und Frohberg-Logos.

Ein neuer Typus wurde von Lindner (2) in dem *Schizos. Pombe* (s. S. 189) gefunden, welcher die Würze noch weiter als Hefe *Logos* vergärt. Diese Hefe wurde ausführlich von W. Windisch (2) und F. Rothenbach (1) studiert.

Wir haben somit folgende vier Hefentypen: S, F, Logos und Pombe. Die Ursache der verschiedenen Vergärungsgrade, welche diese Hefen erzeugen, liegt nun zweifellos darin, daß einige derselben nicht nur Maltose (und Hexosen) vergären, sondern auch Dextrine. Das letztere ist von den Hefen *Logos* und *Schizos. Pombe* erwiesen, während es noch an einer wissenschaftlichen Erkenntnis mangelt, worin der Unterschied zwischen den Typen S und F begründet ist. Zwar haben sich zahlreiche Forscher, besonders auch Prior (1), mit dieser Frage beschäftigt, doch sind die Versuche und Hypothesen Prior's, wie auch diejenigen von Bau (15) bisher nicht zu einem endgültigen und anerkannten Resultat gelangt.

Die direkte Prüfung der Vergärbarkeit des Dextrins durch Reinzuchten von Hefen stellte Lindner (1) an. Er erzielte das überraschende Ergebnis, daß viele Arten das Dextrin mehr oder minder stark vergären, ja, selbst unter den Hefen des Typus Saaz finden sich zufolge Lindner (3) einige, welche Dextrin angreifen. Es sind dies die obergärigen Brauereihefen, Typus OS, *Nr. 150*, *159*, *160* und *403*. Die Hefe *Saaz* selbst und mit ihr noch mehrere andere Rassen vom Typus S, und zwar OS und US, vergären dagegen Dextrin nicht. Auch andere obergärige Brauereihefen, Typus OF, greifen Dextrin an, darunter die Burtonhefe; von 40 untersuchten Hefen dieser Gruppe lassen nur 8 das Dextrin intakt.

Die obergärigen Hefen aus Preßhefenfabriken vergären fast durchweg Dextrin stark, von 13 Rassen ergab nur eine Hefe aus Bayern ein zweifelhaftes Resultat; vergl. Lindner (3).

Demgegenüber besitzen die eigentlichen Brennereihefen im allgemeinen nur ein geringes oder gar kein Vermögen, Dextrin zu vergären; von den untersuchten Rassen verhielt sich die Hälfte gegen dieses Kohlenhydrat ablehnend.

Von 33 untergärigen Brauereihefen vergor nur eine Dextrin stark, eine andere gering, bei 14 Rassen war das Resultat zweifelhaft; vergl. Lindner (3).

Auch unter den Weinhefen finden sich einige Rassen, welche Dextrin vergären; vergl. Lindner (3).

Die von Lindner untersuchten Kahmhefen vergären Dextrin nicht, dagegen greifen die Arten der Gattung *Willia* (s. S. 186) dieses Kohlenhydrat scheinbar schwach an, nur eine Art, *W. belgica*, vergärt Dextrin sicher nicht.

Die wilden Hefen mit botanischem Namen, *S. Pastorianus I, II, III, S. ellipsoideus, S. cratericus*, vergären Dextrin mehr oder minder stark; von 31 untersuchten anderen wilden Hefen sind 13 Reinzuchten bekannt, welche in Dextrinlösungen schwach oder deutlich Kohlensäure entwickeln.

Von anderen Organismen, welche Dextrin vergären, seien *S. exiguus, Monilia candida, Mon. variabilis, Sachsia suaveolens, Mucor Rouxii, Amylomyces β* und *Am. γ*, Hefe *Logos, Schizos. Pombe, Schizos. mellacei* und *Schizos. octosporus* genannt. Und auch eine Reihe von Hefen aus Danziger Jopenbier greifen dieses Kohlenhydrat an.

Ueber die Vergärbarkeit der Dextrine durch spezielle Hefen ergibt sich nun nach P. LINDNER's Forschungen gar keine bestimmte Regel; es erscheint vielmehr dringend nötig, diese Untersuchungen unter der von C. J. LINTNER gegebenen Direktive fortzusetzen, nur Reinkulturen und reine Dextrine zu verwenden. Die erstere Forderung erfüllte ja LINDNER, doch harrt die zweite Aufgabe noch der Lösung, da die durch Diastasewirkung aus der Stärke entstehenden Dextrine trotz aller umfassenden Arbeiten bisher nicht in einwandfreier Weise und als von der Wissenschaft zweifellos anerkannte chemische Individuen dargestellt wurden.

Wie dem auch sei, so müssen wir annehmen, daß die Dextrine von den Hefen nicht direkt vergoren werden, sondern daß sie, wie alle Polysaccharide, vor der Vergärung durch ein Enzym in direkt vergärbare Zuckerarten gespalten werden müssen. Dieses Enzym, welchem der Name Amylase gebührt, fand KATZ (1) in verschiedenen Schimmelpilzen auf, so in *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten (s. S. 240), wie auch im *Bact. megaterium*. Ueber die Amylase der Hefen haben wir bisher nur recht geringe Kenntnisse, so daß der Ausbau unserer Wissenschaft nach dieser Richtung hin noch viel Arbeit erfordern wird.

Nachdem wir so den augenblicklichen Stand der Frage über die Dextrinvergärung kennen gelernt haben, verstehen wir auch das von EFFRONT (1) genommene Patent zur Heranzüchtung von Hefen, welche Dextrine vergären. Nach EFFRONT vergären gewisse Bierhefen Dextrine, wenn auch nur schwach, jedoch kann man durch Kulturbedingungen ihr Gärvermögen beträchtlich steigern. Die Bierhefen werden zunächst in einem Nährboden gezüchtet, welcher neben Dextrose und Mineralstoffen (Kalisalpeter) auch Aldehyd enthält. Die auf diese Weise vorbereiteten Hefen zeigten eine deutlich hervortretende Neigung, Dextrin zu vergären, welche Eigenschaft durch geeignete Behandlung weiter gesteigert werden kann. Die wissenschaftliche Erklärung für das EFFRONT'sche Verfahren ist jedenfalls nach zwei Richtungen hin zu suchen. Entweder schlummert in jeder Bierhefe ein Enzymogen, welches durch geeignete Züchtung zu einer starken Bildung von Amylase gereizt wird, oder aber es werden durch die Kulturverfahren (vielleicht durch spontane Infektion) gewisse Hefen, die an sich schon Amylase enthalten, bevorzugt, so daß diese in den Zuchten die Oberhand gewinnen und in Uebertragung der von DELBRÜCK aufgestellten Gesetze der natürlichen Hefenreinzucht in dem von EFFRONT gewählten „Klima“ dominieren. Eine exakte Untersuchung nach der einen oder anderen Richtung hin steht noch aus. Und auch über den Erfolg des EFFRONT'schen Patentes in der Praxis ist bisher nichts bekannt geworden.

§ 98. Die Selbstgärung der Hefe.[1])

Sieht man von einer zwar vorgängigen, aber wenig bestimmten Aeußerung BERTHELOT's (4) ab, so darf man sagen, daß PASTEUR es war, welcher zuerst die Beobachtung gemacht hat, daß unter Umständen die durch Hefe aus einer Lösung von Zucker entbundene Kohlensäure 5 einschließlich des gleichzeitig entstandenen Alkohols viel mehr ausmachen kann, als rechnerisch aus der Menge des in der Nährlösung zu Anfang vorhandenen Zuckers erwartet werden könnte. So gaben z. B. 0,424 g Zucker mit 10 g Hefe (auf Trockenrückstand bezogen) nicht ungefähr 110 ccm Kohlensäure, wie sich aus der Umsetzungsgleichung 10 ableiten läßt, sondern 300 ccm, nebst 0,6 g Alkohol. Weil von dieser Ausbeute nicht alles, sondern nur ein Teil durch die Menge des in der Nährlösung gebotenen Zuckers gedeckt ist, so muß der Rest aus Bestandteilen der Hefenzellen selbst hervorgegangen sein. Diese haben also die Fähigkeit, nicht nur den Zucker ihrer Umgebung sondern auch 15 Bestandteile ihres eigenen Leibes, also bis zu einem gewissen Maße sich selbst, zu vergären. Und tatsächlich entsteht auch unter besonderen Bedingungen (vorhergegangene reichliche Ernährung, Behinderung des Zutretens der Luft u. e. a.) in einer Hefenmasse, ohne daß man ihr auch nur ein Stäubchen Zucker zugesetzt hätte, eine oft recht ansehn- 20 liche Menge von Alkohol. Man spricht in solchem Falle von Selbstgärung.

Die Erklärung, welche PASTEUR von dieser Erscheinung gab, ging dahin, daß in den Hefenzellen ein Stoff vorhanden sei, welcher nacheinander in Zucker übergeführt und dann vergoren werde. Durch 25 Kochen mit sehr verdünnter Schwefelsäure hatte dieser Forscher aus Hefe nicht weniger als 20 Proz. gärungsfähigen Zucker (auf Hefentrockensubstanz bezogen) gewinnen können. Wenn er jedoch weiterhin annahm, daß man als Quelle dieses Zuckers die Wand der Zelle zu betrachten habe, so war er im Irrtum, welcher seinem Gegner LIEBIG (1) 30 sehr zu statten kam. Dieser letztere konnte an mehreren Proben von Hefe nachweisen, daß deren Gehalt an Cellulose, d. h. an dem nach dem damals üblichen Auslaugeverfahren verbleibenden Rückstande, beträchtlich weniger ausmachte, als erforderlich gewesen wäre, wenn daraus die gesamte Menge des bei der Selbstgärung auftretenden Alkohols 35 hätte hervorgehen sollen. So lieferten, um nur ein Beispiel LIEBIG's anzuführen, 100,6 g Hefe, welche zufolge einer vorgenommenen Untersuchung 18,9 Proz. an sogen. Cellulose enthielten, auf dem Wege der Selbstgärung 13,9 Proz. Alkohol, während rechnerisch höchstens 11,3 Proz. aus jener Cellulosemenge entstehen können. Wenn nun LIEBIG diese 40 Feststellung als eine Stütze seiner eigenen Gärungstheorie zu betrachten geneigt war, so muß man ihm entgegenhalten, daß er dadurch wohl eine (den Kernpunkt der Frage übrigens gar nicht berührende) irrtümliche Meinung seines französischen Gegners berichtigt, aber nicht auch dessen Erklärung des Wesens der Selbstgärung widerlegt hat. Die 45 durch NÄGELI und LOEW (1) gegen LIEBIG's Darlegung ins Treffen ge-

[1]) Dieser Paragraph ist vorwiegend nach den Angaben des Herrn Professors LAFAR behandelt, wie derselbe mich auch an anderen Stellen des 18. und des 19. Kapitels in hervorragender Weise unterstützte. Es sei ihm hierfür mein wärmster Dank ausgesprochen. 50

führte Gegenbehauptung, daß in der Hefe eine größere Menge (bis zu 37 Proz.) von Cellulose enthalten sei, als dieser letztere angegeben hatte, ist jedoch aus dem Grunde nicht stichhaltig, weil sie auf dem Ergebnisse von analytischen Ermittelungen fußt, bei denen nicht die sogen. Cellulose allein gewogen worden ist, sondern ein Gemisch von dieser mit anderen, schleimigen Stoffen (s. S. 46), unter denen sich wahrscheinlich das damals als solches noch nicht erkannte Glycogen befunden hat.

Nachdem Salkowski (2) die Beobachtung gemacht hatte, daß mit Chloroformwasser digerierte Hefe nicht der Selbstgärung unterliegt, vielmehr einen linksdrehenden Zucker abscheidet, kam er zu der Ueberzeugung, daß die Quelle dieses Zuckers im Glycogen zu suchen sei. Zu dem gleichen Ergebnis gelangte Cremer (1 u. 2), nur wies dieser Forscher nach, daß der entstandene Zucker die rechtsdrehende d-Glucose sei. In der richtigen Erkennung des Zuckers hatte Salkowski einen Irrtum begangen, den er (2) auch später berichtigte.

Die Selbstgärung verläuft also auf Kosten des Glycogens. Neben dem Abbau dieses Kohlenhydrates gehen noch andere Umsetzungen her, die man früher, so auch noch Kutscher (1), ebenfalls als Selbstgärung betrachtete. Es sind dies Vorgänge, welche die Umwandlung der Stickstoffkörper betreffen. Nach M. Schenck (1) muß man indessen scharf zwischen Selbstgärung und Selbstverdauung der Hefe unterscheiden; wir werden die letztere Umsetzung der Hefe in dem 20. Kapitel dieses Bandes kennen lernen.

Hier soll indessen noch die weitere Bemerkung angefügt werden, daß während des Verlaufes der Selbstgärung, ja vielleicht durch sie ganz unmittelbar, auch aromatische Riechstoffe entstehen. Solcher Obstgeruch entwickelt sich insbesondere dann recht kräftig, wenn die Hefe im gepreßten Zustande aufbewahrt wird. Er ist dem Praktiker wohl bekannt. Nähere Untersuchungen über Art und Entstehungsweise dieser Aromabildner würden erwünscht sein. Man vergl. Bd. V, S. 107.

Ueber das Glycogen sind bereits auf S. 96 dieses Bandes einige Mitteilungen gemacht worden.

In Hinblick auf die amorphe Natur dieses Kohlenhydrates wird man von der von Laurent gemachten Angabe überrascht sein, daß die Hefenzellen fähig seien, das in einer Nährlösung enthaltene Glycogen aus dieser zu entnehmen und anzusammeln. Dieser Behauptung ist durch Cremer (1) wie auch durch Koch und Hosaeus (1) widersprochen worden. An einer obergärigen, wie auch an zwei untergärigen Hefen konnten die letztgenannten Forscher die Beobachtung machen, daß das dem Nährboden (Würze, bez. Fleischextraktlösung mit und ohne Traubenzuckerzusatz) zugefügte Glycogen, und zwar ebensowohl solches aus Tierleber wie auch solches aus Preßhefe, nicht nur ohne nachweisliche Verwertung und Ausnützung blieb, sondern sogar noch herabstimmend auf die Zellvermehrung und auf die Gärkraft wirkte, so daß also die Hefenernte und der Alkoholgehalt in den mit Glycogen versetzten Zuchten geringer ausfiel als in den davon freien. In den zuckerfreien Zuchten konnten die genannten Forscher die Entstehung von Alkohol nicht bemerken. Sie schlossen aus diesem Befunde auf das Unvermögen der Hefenzellen zur Ausscheidung eines hydrolysierenden Enzymes, durch welches das Glycogen der Nährlösung in vergärbaren Zucker hätte übergeführt werden können. Demgegenüber sei bemerkt, daß Cremer (1 u. 2) beim Behandeln von Hefe mit Chloroformwasser Hydrolyse des Glycogens eintreten sah, was auch aus den Arbeiten Salkowski's (2 u. 3) hervorgeht.

Weil jedoch die im Innern der Zellen sich abspielende Verarbeitung des dort angesammelten Glycogens wahrscheinlich mit einer derartigen Hydrolyse anheben wird, darf man das Vorkommen eines solchen Enzymes innerhalb der Zelle mit großer Wahrscheinlichkeit voraussagen. Diese ist fast nun zur Gewißheit geworden durch die von BUCHNER und RAPP (1) gemachte Feststellung, daß das Glycogen durch Hefenpreßsaft vergoren wird. Ein derartiges Enzym wird man auch in anderen Pilzen, welche Glycogen aufspeichern, als vorhanden annehmen dürfen.

Dieses Enzym, welchem man den Namen Glycogenase beilegen könnte, hat voraussichtlich die Eigenschaft, daß es die Hefenmembran nicht durchdringt, sondern nur innerhalb der Zelle wirkt, wie schon daraus hervorgeht, daß das freigelegte Enzym im Preßsaft zugesetztes Glycogen zur Vergärung vorbereitet. Es werden der in gewisser Beziehung noch vorläufig hypothetischen Glycogenase die Wirkungen zukommen, daß sie nicht allein hydrolysiert, sondern in hohem Maße befähigt ist, auch das Glycogen wieder unter bestimmten Bedingungen aufzubauen; wir haben ja schon auf S. 415 und 421 in betreff der Maltase und der Lactase bemerken können, daß diese zwei Enzyme neben ihrer hydrolysierenden Tätigkeit auch die sogen. reversible Wirkung zu entfalten vermögen. Ueber die Bedingungen, unter welchen sich Glycogen in den Hefenzellen anreichert oder wieder daraus verschwindet, hat HENNEBERG (2) ausführliche Studien angestellt; wir können nach ihm (3) auch annehmen, daß der *Sacch. apiculatus* Glycogenase nicht enthält. Auf alle Fälle wäre es ein dankbares Arbeitsgebiet, dieser Glycogenase weiter nachzuspüren, da wir von ihrer immerhin noch hypothetischen Existenz nur die beiden schon erwähnten Eigenschaften voraussagen konnten.

Der für die Zwecke der Freimachung von Spannkraft sich einstellende Abbau des Glycogens kann entweder schon auf halbem Wege stehen bleiben, indem sich, wie bei der Selbstgärung, Alkohol und Kohlensäure bildet, oder aber er kann bis zur vollständigen Verbrennung dieses Kohlenhydrates zu Kohlensäure und Wasser vorschreiten. Das letztere findet bei den Hefenzellen, soweit bisher bekannt ist, gewöhnlich in dem Falle statt, wenn die Luft unmittelbar Zutritt hat. Nicht immer jedoch kommen die Hefenzellen dazu, das aufgespeicherte Glycogen auch zu verbrauchen. Manchmal erlischt ihre Lebenskraft schon viel früher. Nach den von H. WILL (1) gemachten Beobachtungen kann man in der Bodensatzhefe von alten Zuchten in Würze oder in durch die Hefe selbst verflüssigter Würzegelatine immer auch tote Hefenzellen mit starkem Glycogengehalt auffinden. Schließlich sei bemerkt, daß der Augenblick des Beginnes der Verarbeitung des aufgespeicherten Glycogens nicht immer mit dem Eintritte des Mangels an benötigten Nährstoffen außerhalb der Zelle zusammenfällt, sondern auch noch durch andere Umstände, insbesondere durch das Alter der Zellen, mit bestimmt zu werden scheint, so daß also der Glycogengehalt einer Hefenprobe sinken kann, obgleich noch Zucker in der Nährlösung vorhanden ist. M. JODLBAUER (1) hat gelegentlich dahingehende Beobachtungen gemacht; auch GONTSCHARUK's Befunde, die R. MEISSNER (1) mitteilt, stimmen damit überein.

Ueber die Beeinflussung der Selbstgärung durch verschiedene Agentien sollen hier noch einige Angaben gemacht werden. Wie wir schon auf S. 432 kennen lernten, wird nach SALKOWSKI und CREMER durch Digestion mit Chloroformwasser die Hefe so beeinflußt, daß zwar das Glycogen gespalten wird, die Hefe indessen nicht in Selbstgärung

gerät. Die gleiche Wirkung kann man nach C. J. LINTNER (4) durch einen Zusatz von Kochsalz erreichen. Auch den Einfluß anderer Salze untersuchte der genannte Forscher, indem er stets je 5 g des Salzes zu je 10 g abgenutschter glycogenreicher Unterhefe von ungefähr 25 Proz. 5 Trockengehalt zusetzte. Es zeigte sich, daß die Selbstgärung in jenen Proben nicht eintrat, welchen ein Chlorid des Natriums, Calciums, Magnesiums, Aluminiums oder das Chlorid, Nitrat oder Sulfat des Ammoniums zugegeben worden war. Hemmend wirkten die Sulfate von Mangan und Kupfer, sowie das Kaliumnitrat. Hingegen wurde als stark be- 10 günstigend gefunden: ein Zusatz von einem Sulfate des Natriums, des Zinks, des Magnesiums oder des Eisenoxyduls und ferner von Monokaliumphosphat. Es kann demnach bei einer an Glycogen sehr reichen Hefe die Selbstgärung unter Umständen ausbleiben, wenn hemmende Stoffe zugegen sind.

15 Für die Praxis des analytischen Chemikers hat die Selbstgärung der Hefe einige Bedeutsamkeit, und zwar für den Fall, daß in einer vorgelegten Probe der Zuckergehalt auf physiologischem Wege (vergl. S. 323) ermittelt werden soll. Zwar besitzen wir Methoden, bei welchen nach Möglichkeit der Einfluß der Hefe nicht allein in bezug 20 auf Selbstgärung sondern auch mit Rücksicht auf die anderen durch die Hefe hervorgerufenen Umsetzungen (vergl. S. 378 u. 395) ausgeschaltet wird, wenn man z. B. nach ELION (1) oder nach BAU (14) die vorher sterilisierte Lösung mit einer unwägbaren Spur Hefe beimpft. Jedoch erfordern derartige Untersuchungen bis zu ihrer Durchführung einen längeren 25 Zeitraum, der für rein wissenschaftliche Studien allerdings nicht in Frage kommt, für praktische Zwecke indessen trotz der auf diesem Wege erzielten Genauigkeit sich hindernd in den Weg stellt. Für eine schnelle Untersuchung, eine sogen. Handelsanalyse, ist man genötigt, eine stärkere Aussaat zu geben. Bei diesem Verfahren muß man nun mit dem Glycogen- 30 gehalt und der Selbstgärung der Hefe rechnen, gleichgültig, ob man den Zucker aus der entwickelten Kohlensäuremenge oder aus dem erzeugten Alkohol bestimmt; bei dem Verfahren nach ELION und BAU läßt man diese Derivate außer acht und bestimmt nur die durch die Gärung hervorgerufene Extraktverminderung, welche, durch Kupferreduktion und 35 Polarisation ergänzt, den wahren Zuckergehalt angibt. Bei der Ausführung einer sogen. Handelsanalyse hat man die Anstellung eines blinden Versuches empfohlen, derart daß man genau die gleiche Menge Hefe einmal mit der zu untersuchenden Flüssigkeit, das zweite Mal mit dem gleichen Quantum destillierten Wassers oder einer zuckerfreien Nähr- 40 lösung beimpft. Wenn man den Gehalt an Zucker durch die entwickelte Kohlensäure bestimmte, so glaubte man durch diese Kontrollprobe den Einfluß der Selbstgärung der Hefe ausschalten zu können. Wir haben aber durch die Versuche C. J. LINTNER's kennen gelernt, daß die einzelnen Salze eine ganz verschiedene Einwirkung auf die Selbstgärung 45 zeigen. Da die nähere Zusammensetzung der zu untersuchenden Flüssigkeit in der Regel unbekannt ist, wird sich der blinde Versuch nie so gestalten lassen, daß in diesem der Hefe eine gleich zusammengesetzte, aber zuckerfreie Lösung dargeboten wird, wie in der zu analysierenden Probe. Wir führen mit dem Kontrollversuch noch unbekannte Größen 50 ein, von denen wir nicht wissen, wie sie auf die Selbstgärung wirken, und schaffen uns somit eine neue, in ihrer Ausdehnung nicht bestimmbare Fehlerquelle. Man hat auch vorgeschlagen, den angesetzten Gärversuch in dem Augenblicke abzubrechen, in welchem zufolge einer vor-

genommenen Prüfung der Zucker der Gegenprobe vollständig vergoren ist; jedoch kann, wie wir weiter oben gesehen haben, der Abbau des Glycogens schon zu einem Zeitpunkte beginnen, zu welchem noch vergärbarer Zucker im Nährboden vorhanden ist. Den Beobachtungen JODLBAUER's zufolge soll diese Gefahr nicht bestehen, wenn auf einen Teil Zucker höchstens zwei Teile teigige Hefe (von etwa 25 Proz. Trockengehalt) zugesetzt werden. Er empfiehlt für die Zwecke der physiologischen Zuckerbestimmung folgendes Verfahren. Man ermittelt in der Probe zunächst qualitativ die Art des vorhandenen Zuckers. Darauf bestimmt man das Reduktionsvermögen des Untersuchungsobjektes gegen FEHLING'sche Lösung (bei Gegenwart von Rohrzucker oder Raffinose nach vorhergegangener Hydrolyse — ist Trehalose zugegen, so versagt diese Methode) und berechnet aus diesem, wie viel von der Probe zu nehmen ist, um darin 2 g Zucker zu haben. Die entsprechende Menge — bei festen Substanzen in 25 ccm Wasser aufgelöst — wird mit 1 g frischer, auf unglasiertem Porzellan oder Tonplatten entwässerter Bierhefe und eventuell (bei nährstoffarmen Substanzen) mit 1 ccm HAYDUCKscher Nährlösung versetzt. Man läßt die Gärung bei etwa 34° verlaufen, leitet einen schwachen Wasserstoffstrom durch die Lösung und fängt die entbundene Kohlensäure im Absorptionsgefäß auf. Erlaubt das Ergebnis der fortlaufenden Prüfung eines Parallelversuches die Annahme, daß auch im Hauptkolben aller Zucker gerade aufgebraucht sei, dann unterbricht man den Hauptversuch, treibt durch vorsichtiges Kochen bei ständigem schwachen Durchleiten von Wasserstoff die in der Gärungsflüssigkeit noch absorbierte und im Luftraum des Kolbens vorhandene Kohlensäure in den Absorptionsapparat über und berechnet aus der Gewichtszunahme des letzteren die Menge des vergorenen Zuckers. Trotz aller vorzüglichen Arbeiten JODLBAUER's auf diesem Gebiete dürfen wir uns nicht verhehlen, daß diese Methode doch nur dann anwendbar ist, wenn andere Hilfsmittel versagen. Die Apparatur muß sehr sorgfältig zusammengestellt sein, um einesteils während des Versuches, der bei Gegenwart von Glucose oder Maltose etwa 20 Stunden, bei Anwesenheit von Rohrzucker die doppelte Zeit in Anspruch nehmen soll, Verluste an Gärungskohlensäure zu vermeiden, andernteils aber die atmosphärische Kohlensäure fernzuhalten.

Die hier gemachten Darlegungen müssen auch von jenen berücksichtigt werden, welche in einem Harne den Zuckergehalt auf gärungsphysiologischem Wege bestimmen wollen. Nähere Angaben über das hierbei geübte Verfahren und das anzuwendende EINHORN'sche Gärungssaccharometer, das dem auf S. 572 des Ersten Bandes abgebildeten Gärkölbchen ähnlich ist, findet man in den Handbüchern über Harnanalyse, von denen das von NEUBAUER und VOGEL hervorzuheben ist, dessen letzte drei Auflagen H. HUPPERT (1) besorgt hat. Diese Handbücher für Harnanalyse empfehlen nun stets die Anstellung eines Kontrollversuches, um zu sehen, wieviel Kohlensäure die Hefe beim Digerieren mit Wasser allein entbindet. Wenn somit hier auch die Frage der Selbstgärung gestreift wird, so lassen die gegebenen Vorschriften doch an Genauigkeit zu wünschen übrig und nehmen vor allen Dingen keine Rücksicht auf den möglichen Glycogengehalt der Hefe. Ein besonderes Verdienst in dieser Beziehung haben sich E. BUCHNER und S. MITSCHERLICH (1) durch die Angabe eines Verfahrens zur Darstellung einer glycogenfreien Hefe erworben. Indem sie sich HENNEBERG's (1) Beobachtungen zunutze machten, behandelten sie die Hefe in der Weise, daß

sie das abgepreßte und gesiebte Material in dünner Schicht an der Luft ausbreiteten. Hält man die Hefe nun im Eisschrank (bei etwa + 2°), so ist nach ungefähr einem Tage kein Glycogen mehr nachzuweisen; bei ca. 20° verschwindet dieses in acht Stunden und im Thermostaten 5 bei 35—45° bereits in drei bis vier Stunden. Eine Schwächung der Gärkraft tritt in der so behandelten Hefe meist nicht ein. Die genannten Forscher betonen, daß zum Nachweise von Zucker im Harn eine möglichst glycogenfreie Hefe Verwendung finden muß, weil Hefen mit hohem Glycogengehalt unter Umständen Zuckergehalt im Harne vor-10 täuschen können. Die unter dem Namen Zymin im Handel vorkommende Dauerhefe eignet sich zu diesem Zwecke nicht, denn sie enthält Glycogen; vergl. dazu S. 362.

Noch eine Schlußbemerkung sei hier gestattet. Manche von den mit dem Vergärungsgrade der Hefen sich beschäftigenden wissenschaft-15 lichen Abhandlungen wird auf eine andere Bewertung sich gefaßt machen müssen, sobald man an sie mit der Frage herantritt, ob darin auch auf die Möglichkeit des Mitspielens von Selbstgärung gebührend Rücksicht genommen worden ist. Alle Versuche, bei denen eine größere Menge von Hefe in ein und derselben Probe in Tätigkeit gebracht worden ist, 20 bedürfen einer Nachprüfung in diesem Sinne.

Literatur

zum Kapitel Enzyme, welche Disaccharide und Polysaccharide spalten.

*Amthor, Karl, (1) Z. f. angew. Chem., 1892, S. 319. *Axenfeld, D., (1) Centralbl. f. Physiologie, 1903, Bd. 17, S. 268. *Barfoed, C., (1) J. f. prakt. Chem., 1873, Bd. 6, S. 334. *Barth, G., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1878, Bd. 11, S. 474. *Bau, Arminius, (1) Chem.-Ztg., 1895, Bd. 19, S. 1873. — (2) Ebenda, 1892, Bd. 16, S. 143, und W. f. Brauerei, 1892, Bd. 9, S. 193. — (3) W. f. Brauerei, 1902, Bd. 19, S. 44. — (4) Ebenda, 1903, Bd. 20, S. 560. — (5) Zeitschr. d. Vereins d. Deutsch. Rübenzucker-industrie, 1904, Bd. 54, S. 481. — (6) Chem.-Ztg., 1894, Bd. 18, S. 1794. — (7) W. f. Brauerei, 1899, Bd. 16, S. 397. — (8) Chem.-Ztg., 1897, Bd. 21, S. 185. — (9) W. f. Brauerei, 1894, Bd. 11, S. 1366. — (10) Ebenda, 1898, Bd. 15, S. 389. — (11) Z. f. Spiritusindustrie, 1894, Bd. 17, S. 374; 1895, Bd. 18, S. 372; 1898, Bd. 21, S. 241. — (12) W. f. Brauerei, 1899, Bd. 16, S. 305. — (13) Ebenda, 1900, Bd. 17, S. 698. — (14) Chem.-Ztg., 1892, Bd. 16, S. 1473; 1893, Bd. 17, S. 392. — (15) W. f. Brauerei, 1895, Bd. 12, S. 431. *Beijerinck, M. W., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1895, Bd. 1, S. 221. — (2) Centralbl. f. Bakt., 1889, Bd. 6, S. 44. *Bernheim, H., (1) Ref. in Centralbl. f. Bakt., 1889, Bd. 5, S. 126. *Berthelot, M., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1860, Bd. 50, S. 980. — (2) Ebenda, 1855, Bd. 41, S. 392. — (3) Ebenda, 1889, Bd. 109, S. 548. — (4) Ebenda, 1856, Bd. 43, S. 238. *Biot und Persoz, (1) Ann. de chim. et de phys., 1833, Bd. 53, S. 83. *Bokorny, Theodor, (1) Chem.-Ztg., 1901, Bd. 25, S. 502; 1902, Bd. 26, S. 701; 1903, Bd. 27, S. 502. *Bourquelot, E., (1) Comptes rendus Soc. de biologie, 1893, S. 653, und Comptes rend. de l'Ac., 1893, Bd. 116, S. 1143; Bd. 117, S. 826. — (2) Comptes rend. de l'Ac., 1903, Bd. 136, S. 762. — (3) Ebenda, 1898, Bd. 126, S. 1045; 1901, Bd. 133, S. 690; 1902, Bd. 135, S. 399. *Bourquelot und Hérissey, H., (1) J. de pharm. et de chim., 1897, Bd. 4, S. 385, und Comptes rend. de l'Ac., 1901, Bd. 132, S. 571. *Brown, Horace T., und Morris, G. H., (1) Chem.-Ztg., 1893, Bd. 17, S. 655. — (2) Liebigs Ann., 1885, Bd. 231, S. 134. — (3) Journal Chemical Soc., 1889, S. 449 u. 462. *Buchner, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1897, Bd. 30, S. 1110. *Buchner, Eduard, und Meisenheimer, Jacob, (1) Z. f. physiolog. Chem., 1903, Bd. 40, S. 167. *Buchner, Ed., und Mitscherlich, Sigurd, (1) Z. f. physiolog. Chem., 1904, Bd. 42, S. 554. *Buchner, Ed., und Rapp, Rudolf, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1898, Bd. 31, S. 209. *Chrzaszcz, T., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1901, Bd. 7, S. 326. *Cremer, Max, (1) Z. f. Biologie, 1894, Bd. 31, S. 183; 1895, Bd. 32, S. 1. — (2) Sitzungsber. der Ges. f. Morphologie und Physiologie in München, 1894, Heft 1. *Delbrück, Max, (1) Chem.-Ztg., 1899, Bd. 23, S. 176. *Donath, Ed., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1875, Bd. 8, S. 795. — (2) Chem.-Ztg., 1892, Bd. 16, S. 459. *Downes und Blunt, (1) Proc. Royal Soc. London, 1877, Bd. 26, S. 488; 1878, Bd. 28, S. 199. *Duclaux, Emil P., (1) Traité de microbiologie, Bd. 2, S. 222. — (2) Ann. Pasteur, 1889, Bd. 3, S. 67. *Düll, G., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1894, Bd. 17, S. 79.

*Dumas, (1) Comptes rend. de l'Ac., 1872, Bd. 75, S. 295. *Effront, Jean, (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1898, Bd. 21, S. 298; 1899, Bd. 22, S. 126. *Elion, H., (1) Z. f. angew. Chem., 1890, S. 321. *Emmerling, O., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1901, Bd. 34, S. 3810. — (2) Ebenda, S. 600. *Erlenmeyer und Planta, Adolf von, (1) Biedermanns Centralbl., 1875, Bd. 7, S. 25. *Fermi, Claudio, und Montesano, G., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1895, Bd. 1, S. 482. *Fernbach, A., (1) Ann. Pasteur, 1890, Bd. 4, S. 641. — (2) Ebenda, 1889, Bd. 3, S. 473 u. 531. — (3) Ebenda, 1890, Bd. 4, S. 1. *Fischer, Emil, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1894, Bd. 27, S. 2988 u. 3251. — (2) Ebenda, 1895, Bd. 28, S. 1429. — (3) Ebenda, 1890, Bd. 23, S. 3687. — (4) Ebenda, 1895, Bd. 28, S. 3024. — (5) Ebenda, 1894, Bd. 27, S. 2985. *Fischer, Emil, und Armstrong, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1902, Bd. 35, S. 3151. *Fischer, Emil, und Lindner, Paul, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1895, Bd. 28, S. 3034. — (2) Ebenda, S. 984. *Fischer, Emil, und Niebel, (1) Sitzungsber. der Preuß. Akad. d. Wissensch., 1896, 30. Jan. *Fresenius, (1) Z. f. analyt. Chem., 1891, Bd. 30, S. 669. *Géduld, Robert, (1) Ref. in W. f. Brauerei, 1891, Bd. 8, S. 545. *Gillot, Henri, (1) Bull. de l'ass. belge des Chimistes, 1902, Bd. 16, S. 240. — (2) Ebenda, 1900, Bd. 13, S. 496, und Bull. de l'Ac. Royale Belgique, 1899, S. 221. *Griffith, (1) Chemical News, 1886, Bd. 53, S. 28. *Gunning, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1875, Bd. 5, S. 821. *Hahn, Martin, (1) Z. f. Biologie, 1900, Bd. 40, S. 172. *Hansen, Emil Chr., (1) Untersuchungen aus d. Praxis d. Gärungsindustrie, München u. Leipzig 1888, Heft 1, S. 62. *Hartmann, M., (1) W. f. Brauerei, 1903, Bd. 20, S. 113. *Henneberg, Wilh., (1) W. f. Brauerei, 1900, Bd. 17, S. 633. — (2) Z. f. Spiritusindustrie, 1902, Bd. 25, S. 378. — (3) Ebenda, S. 553. *Hiepe, W., (1) J. federated Inst. Brewing, 1895, Bd. 1, S. 288. *Hill, Croft, (1) Proc. Chemical Soc., 1898, S. 156, und Transactions Chemical Soc., 1898, Bd. 73, S. 634. — (2) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1901, Bd. 34, S. 1380. — (3) Chem.-Ztg., 1903, Bd. 27, S. 391. *Hoppe-Seyler, Felix, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1871, Bd. 4, S. 810. *Huppert, H., (1) Anleitung z. qualit. und quantit. Analyse d. Harns. 10. Aufl., Wiesbaden 1898. *Issaew, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1900, Bd. 23, S. 796. *Jalowetz, (1) Mitteil. d. Oesterr. Versuchsstation f. Brauerei u. Mälzerei in Wien, 1894; ref. in Chem.-Ztg., 1894, Bd. 18, Rep., S. 39. *Jodlbauer, Max, (1) Zeitschr. d. Vereins f. Rübenzuckerindustrie, 1888, Bd. 25, S. 308. *Jones, (1) The Analyst, 1889, Bd. 14, S. 81. *Kalanthariantz, A., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1898, Bd. 26, S. 88. *Katz, Oskar, (1) Jahrb. wiss. Bot., 1898, Bd. 33, S. 599. *Kayser, Edm., (1) Ann. Pasteur, 1891, Bd. 5, S. 395. *Kjeldahl, (1) Meddelelser fra Carlsberg Labor., 1881, Bd. 3, S. 186. *Kobert, Rud., (1) Pflügers Archiv, 1903, Bd. 99, S. 116. *Koch, Alfred, und Hosaeus, Hans, (1) Centralbl. f. Bakt., 1894, Bd. 16, S. 145. *Kröber, Eduard, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1895, Bd. 18, S. 337. *Kutscher, Fr., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1901, Bd. 32, S. 59. *Laborde, J., (1) Ann. Pasteur, 1897, Bd. 1, S. 1. *van Laer, H., (1) Transactions federated Institutes of Brewing, 1894, Bd. 7, Nr. 3. — (2) Moniteur scientifique, 1895, S. 499. *Liebig, J., (1) Liebigs Ann., 1870, Bd. 153, S. 8. *Lindner, Paul, (1) W. f. Brauerei, 1900, Bd. 17, S. 713. — (2) Ebenda, 1893, Bd. 10, S. 1298. — (3) Mikroskopische Betriebskontrolle etc., 3. Aufl., Berlin 1901, S. 358. *Lintner, C. J., (1) Forschungsberichte über Lebensmittel usw., 1894, Bd. 1, S. 275. — (2) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1892, Bd. 15, S. 106; 1894, Bd. 17, S. 414. — (3) Ebenda, 1892, Bd. 15, S. 6. — (4) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1899, Bd. 5, S. 793. — (5) Z. f. angew. Chem., 1892, S. 328. *Lintner, C. J., und Düll, G., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1893, Bd. 26, S. 2533. *Lintner, C. J., und Kröber, Eduard, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1895, Bd. 28, S. 1050. *Lippmann, E. O. von, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1903, Bd. 36, S. 331. — (2) Die Chemie der Zuckerarten. Braunschweig 1904, S. 1623. *Loew, Oskar, (1) Chem.-Ztg., 1900, Bd. 24, S. 1137. *Loiseau, D., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1889, Bd. 109, S. 614. *Mayer, Adolf, (1) Die Lehre v. d. chemischen Fermenten oder Enzymologie. Heidelberg 1882, S. 64. — (2) Ebenda, S. 20. — (3) Ebenda, S. 30. — (4) Ebenda, S. 41. — (5) Ebenda, S. 70. — (6) Ebenda, S. 100. *Medicus und Immerheiser, (1) Z. f. analyt. Chem., 1891, Bd. 30, S. 665. *Meissner, Richard, (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1900, Bd. 6, S. 517. *Moreau, (1) Ann. de la Soc. Royale des Sciences médicales et naturelles de Bruxelles, 1904, 64. Jahrg., Bd. 12, Heft 3; ref. in W. f. Brauerei, 1905, Bd. 22, S. 37. *Moritz, E. R., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1891, Bd. 14, S. 199. *Moritz, J., (1) Landw. Jahrbücher, 1884, S. 929. *Moritz, E. R., und Morris, G. H., (1) Handbuch der Brauwissenschaft. Deutsch von W. Windisch. Berlin 1893, S. 164. *Morris, G. Harris, (1) Brewing Trade Review, 1895, S. 91. — (2) J. federated Inst. Brewing, 1896, S. 350. *Mudie, (1) Journ. f. Pharmacie, 1832, Bd. 18, S. 705. *Nasse, (1) Arch. f. Hyg., 1875, Bd. 11, S. 138. — (2) Ebenda, 1877, Bd. 15, S. 471. *Nägeli, C., und Loew, O., (1) Sitzgsber. d. Kgl. Bayr. Akad. d. Wiss. in München, 1878, Bd. 8, S. 161. *Osborne, W. A., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1899, Bd. 28, S. 399. *Ost, (1) Chem.-Ztg., 1896, Bd. 20, S. 762. — (2) Ber. d. Deutsch. Chem.-Ges., 1890, Bd. 23, S. 3006. *O'Sullivan,

Cornelius, (1) Transactions federated Institutes Brewing, 1893, Bd. 6, S. 67. ***O'Sullivan und Tompson,** (1) Journal Chemical Soc., 1890, Bd. 57, S. 834. ***Pautz und Vogel,** (1) Z. f. Biologie, 1895, Bd. 32, S. 304. ***Persoz,** (1) Ann. de chim. et de phys., 1834, Bd. 56, S. 361. ***Planta, Adolf von, und Schulze,** Ernst, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1890, Bd. 23, S. 1692; 1891, Bd. 24, S. 2705. ***Pottevin und Napias,** (1) Comptes rendus Soc. de biologie, 1898, 10. sér., Bd. 5, S. 237. ***Prior,** E., (1) Bayer. Brauerjournal, 1892, Bd. 2, S. 1; 1894, Bd. 4, S. 469; 1895, Bd. 5, S. 97. ***Puriewitsch,** K., (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1896, Bd. 14, S. 210. ***Raumer, Ed. von,** (1) Z. f. angew. Chem., 1890, S. 421. ***Rischbiet und Tollens,** B., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1885, Bd. 18, S. 2611. ***Rommel,** W., und **Sitnikoff,** A., (1) Bull. de l'ass. belge des Chimistes, 1903, Bd. 18, S. 1049. ***Rothenbach,** F., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1896, Bd. 19, S. 8. ***Salkowski,** E., (1) Ref. in Malys Jahresberichte, 1877, Bd. 7, S. 286. — (2) Pflügers Archiv, 1890, Bd. 52, S. 554. — (3) Z. f. Biologie, 1895, Bd. 32, S. 468. ***Scheibler,** C., und **Mittelmeier,** H., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1885, Bd. 18, S. 1779. — (2) Ebenda, 1889, Bd. 22, S. 3120. — (3) Z. f. angew. Chem., 1891, S. 407. ***Schenck,** (1) W. f. Brauerei, 1905, Bd. 22, S. 221. ***Schifferer,** Anton, (1) Ueber die nicht kristallisierbaren Produkte der Stärke. Baseler Dissert., Kiel 1892, S. 40. ***Schukow,** J., (1) W. f. Brauerei, 1899, Bd. 16, S. 195. ***Simáček,** Eugen, (1) Centralbl. f. Physiologie, 1903, Bd. 17, S. 209. ***Stoklasa,** J., und **Czerny,** (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1903, Bd. 36, S. 622. — (2) Ebenda, S. 4058. ***Tanret,** C., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1902, Bd. 134, S. 1586. ***Tollens,** B., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1885, Bd. 18, S. 26 u. 2611, und Liebigs Ann., 1886, Bd. 232, S. 169. — (2) Handbuch der Kohlenhydrate. Breslau 1896, Bd. 2, S. 186. ***Urech,** (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1885, Bd. 18, S. 3048. ***Varry,** Guérin, (1) Ann. de chim. et de phys., 1835, Bd. 60, S. 69. *Vereinbarungen zur einheitlichen Untersuchung und Beurteilung von Nahrungs- und Genußmitteln, (1) Berlin, 1897, Heft 1, S. 7; 1899, Heft 2, S. 118. — (2) Heft 2, S. 118. ***Wehmer,** Carl, (1) Centr. f. Bakt., 2. Abt., 1900, Bd. 6, S. 610. ***Weinland,** (1) Z. f. Biologie, 1901, Bd. 38, S. 16 u. 606. ***Went,** (1) Jahrb. wiss. Bot., 1901, Bd. 36, S. 611. ***Will,** Hermann, (1) Allgem. Brauer- u. Hopfen-Zeitg., 1892, Bd. 32, S. 1088. ***Windisch,** Karl, (1) Die chemische Untersuchung u. Beurteilung d. Weines. Berlin 1896, S. 100. ***Windisch,** Wilh., (1) W. f. Brauerei, 1899, Bd. 16, S. 72. — (2) Ebenda, 1895, Bd. 12, S. 655. ***Wróblewski,** A., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1898, Bd. 31, S. 1134.

20. Kapitel.

Die Endotryptase und das Philothion.

Von

Prof. Dr. M. Hahn und Dr. Lafar.[1]

§ 99. Die Endotryptase.

Beobachtungen, welche die Gegenwart eines proteolytischen Enzyms in der Hefe nahelegten, sind schon frühzeitig gemacht worden. Namentlich waren es die Erscheinungen, welche im Verlaufe der sogenannten Selbstgärung (s. S. 431) auftreten, die auf das Vorhandensein eines solchen Enzyms aufmerksam machten. Nachdem schon Thénard (1), Pasteur (1) und Duclaux (1) darauf hingewiesen hatten, daß die Hefe im Verlaufe

[1]) Es ist eingelaufen:
§ 99 von Herrn Dr. med. Martin Hahn, Professor a. d. Universität zu München, am 30. Okt. 1906,
§ 100 von Dr. Lafar.

der Gärungen an Gewicht abnimmt und namentlich bedeutend stickstoffärmer wird, machte LIEBIG (1) den Befund von Leucin in dem Wasser, das über einer selbstgärenden Hefe gestanden hatte. BÉCHAMP (1) und SCHÜTZENBERGER (1) waren es zuerst, die bei der Selbstgärung zwei getrennte Prozesse unterscheiden lehrten, deren einer zur Zersetzung der Kohlenhydrate in Alkohol und Kohlensäure führt, während der andere die Zerlegung von Proteinsubstanzen zur Folge hat und damit als ein wirklicher Verdauungsvorgang aufgefaßt werden muß. BÉCHAMP gaben die Befunde von Hydratationsprodukten der Eiweißkörper, die er im Auswaschwasser der Hefe nachwies, Anlaß zu einer physiologischen Gärungstheorie: „An der Hefe, gleichwie an jedem lebenden Organismus, beobachten wir eine doppelte Reihe von Erscheinungen. Zuerst die Erscheinungen der Ernährung und Assimilation, bedingt durch die Anwesenheit ihrer Nährstoffe (Zucker, stickstoffhaltige Substanzen, mineralische Salze): diese verschiedenen Substanzen nämlich treten endosmotisch in die Zellen über, werden hier umgewandelt und zur Neubildung von Geweben für die neu entsprossenden Zellen verwendet. *Parallel diesen Nutritionsvorgängen verlaufen aber umgekehrt die Desassimilationsvorgänge, wodurch die Gewebe in exkrementielle Stoffe umgewandelt werden*, die dem Leben der Zelle nicht mehr zuträglich sind und ausgestoßen werden.“ (Alkohol und Kohlensäure rechnete er ebenfalls dazu.) In neuerer Zeit haben BOULLANGER (1), BEIJERINCK (1), ARTARI (1), WEHMER (1) und besonders WILL (1) die proteolytischen Vorgänge in Hefenkulturen näher studiert, nachdem E. SALKOWSKI (1) durch Digestion von Hefe in Chloroformwasser (s. S. 432) die Lehre von der **Selbstverdauung** („Autolyse“) der Hefe einwandfrei begründet hatte. Eine zellfreie Lösung des Enzyms darzustellen, gelang M. HAHN (1), der in dem nach der Methode von BUCHNER und HAHN hergestellten Preßsaft aus Hefe (s. S. 349) das Vorhandensein eines stark wirksamen proteolytischen Enzyms nachwies, dessen Eigenschaften er mit L. GERET (1) näher studierte und dem er den Namen *Hefenendotryptase* beilegte. Die bei der Selbstverdauung auftretenden Spaltungsprodukte hat dann FR. KUTSCHER (1) vor allem mit den KOSSEL'schen Methoden näher untersucht.

Der *Nachweis* der Endotryptase läßt sich in bequemster und anschaulichster Weise mit dem nach der Methode von BUCHNER und HAHN dargestellten Hefenpreßsaft führen. Einige Kubikzentimeter des Preßsaftes, auf Thymol- oder Karbol-Gelatine (s. Bd. III, S. 122) oder auch auf gewöhnliche Nährgelatine unter Toluol-Zusatz im Reagensglas geschichtet, ergeben schon nach 24 Stunden bei 22 ^{0} C eine deutliche Verflüssigung der Gelatine, die nach 2—3 Tagen bei Anwendung von 10 ccm gewöhnlich vollkommen flüssig geworden ist. Ebenso einwandfrei und überzeugend wirkt aber die Selbstverdauung (Autolyse) des Hefenpreßsaftes: während der frisch bereitete Preßsaft beim Kochen stark koaguliert, zeigt sich in dem bei 37 ^{0} unter Toluol- oder Chloroform-Zusatz aufbewahrten Preßsaft schon nach 24 Stunden ohne Kochen eine Niederschlagsbildung, beim Kochen aber eine deutliche Abnahme des Koagulats, das bei 37 ^{0} C nach 6—7 Tagen, bei Zimmertemperatur nach 10—14 Tagen fast vollständig verschwindet, während sich Aminosäuren, namentlich Leucin, am Boden ausscheiden. Selbstverständlich kann auch der auf S. 352 erwähnte Trockenpreßsaft nach Auflösen in Wasser und Zusatz eines Antiseptikums zum Nachweis der Endotryptase ganz ebenso wie der frische Preßsaft benutzt werden. Mit der in neuerer Zeit in den

Handel gebrachten Dauerhefe (s. S. 362) ist der Endotryptase-Nachweis so zu führen, daß die mit Wasser zu einem dünnen Brei angeriebene Dauerhefe unter Toluol-Zusatz auf Gelatine geschichtet wird, ein Verfahren, das aber nie eine so schnelle Verflüssigung ergibt wie die bei Anwendung des Hefenpreßsaftes erzielte. Auch im Hefenpreßsaft suspendiertes Karminfibrin (s. Bd. III, S. 122) löst sich nach 24 Stunden bei 37° C und färbt die Flüssigkeit dunkelrot, während die Lösung von koaguliertem Eieralbumin sich langsamer vollzieht. Auch in lebenden Kulturen konnte Will (1) die Verflüssigung der Gelatine beobachten, wenn er Stichzuchten von verschiedenen *Saccharomyces*-Arten (s. S. 445) in Bierwürzegelatine anlegte und bei 20° durch 18—80 Tage, bei 13° durch 45—240 Tage beobachtete. Die Verflüssigung begann in der Regel im Stichkanal. Die quantitative Bestimmung der Endotryptase-Wirkung läßt sich gleichfalls in bequemster Weise mit dem Hefenpreßsaft durchführen. Man kann entweder das beim Kochen entstehende Koagulat im frischen und im digerierten Preßsaft trocknen und wägen oder, was sich mehr empfiehlt, die Zunahme des Stickstoffes im Filtrate kontrollieren. Zu diesem Zwecke werden 10 ccm Preßsaft mit Wasser verdünnt, mit etwa 5 ccm gesättigter Kochsalzlösung versetzt, neutralisiert, zum Kochen erhitzt, mit einigen Tropfen Essigsäure angesäuert, nach dem Abkühlen auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt, durch trockene Filter filtriert. In einem aliquoten Teil des Filtrates wird dann der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Wird die Bestimmung so im frischen und im verdauten Preßsaft durchgeführt, so ergibt die Zunahme des Stickstoffes im Filtrat ein sehr genaues Bild von dem Ablauf der Verdauung. Ganz ähnlich gestaltet nach Salkowski (1) sich die Bestimmung bei Verwendung von in Wasser suspendierter Hefe. Auch hier wird vor und nach der Verdauung in dem die Hefe umgebenden, mit Chloroform oder Toluol versetzten Wasser der Stickstoff nach dem Abfiltrieren des Koagulats im Filtrat bestimmt. Für die Eiweißstickstoffbestimmung kann man entweder das ausgefällte Koagulat oder zufolge Iwanoff (1) den nach Stutzer mit Kupferoxyd erhaltenen Niederschlag benutzen.

Von den **Eigenschaften** der **Endotryptase** sei vor allen Dingen das in praktischer Beziehung wichtige Verhalten gegen hohe und niedrige Temperaturen erwähnt: von dem letzteren ist nicht nur die Zersetzung der Eiweißstoffe im Verlaufe des Gärprozesses sondern, wie im 17. Kapitel mehrfach ausgeführt wurde, auch die Tätigkeit der Alkoholase abhängig, weil dieses letztere Enzym durch die gleichzeitig wirkende Endotryptase unter Umständen schädlich beeinflußt werden kann. Alle Versuche betreffend die Eigenschaften der Endotryptase lassen sich in klarster Weise mit dem Hefenpreßsaft durchführen, der gewissermaßen eine Lösung des Enzyms darstellt und bei dessen Anwendung die quantitative Bestimmung der Wirkung am besten ermöglicht wird. Ueber das Temperatur-Optimum und die Vernichtungstemperatur haben Geret und Hahn Nachfolgendes ermittelt (s. Tabelle auf S. 441):

Danach scheint das Temperaturoptimum zwischen 40—45° C zu liegen und das Enzym durch einstündiges Erhitzen auf 60° völlig vernichtet zu werden. In trockenem Zustande, also z. B. auch im Trockenpreßsaft sowie in der Dauerhefe, ist die Endotryptase natürlich erheblich resistenter gegen Erhitzung. Bei niederen Temperaturen (+ 3 bis + 7°) ist die Verdauung zwar, wie ein 14 Tage lang durchgeführter Versuch von Hahn und Geret zeigte, durchaus nicht völlig aufgehoben, aber

Temperatur	Koagulat in Prozenten vor der Digestion	Koagulat in Prozenten nach 20-stündiger Digestion
1. bei + 3° bis 7°	2,72	2,57
2. „ 22°	4,71	3,93
3. „ 37°	4,71	2,71
4. „ + 48°	4,71	2,42

nach einstündigem Erhitzen	Koagulat in Prozenten vor der Digestion	Koagulat in Prozenten nach 20-stündiger Digestion bei 37°
1. auf 50°	3,4	1,36
2. „ 55°	3,4	1,99
3. „ 60°	3,4	3,36
4. nicht erhitzte Kontrollprobe zu 1—3	3,4	0,69
5. auf 65°	2,72	2,57
6. nicht erhitzte Kontrollprobe zu 5	2,72	0,87

doch so erheblich verlangsamt, daß mit Rücksicht auf die Schonung der Alkoholase (s. S. 354) auch diese Feststellungen für die Anwendung niedriger Temperaturen beim Ablauf der gewöhnlichen Hefengärungen sprechen.

Der Einfluß der Gase auf die Endotryptasewirkung scheint, wie bei allen proteolytischen Enzymen, nur ein sehr geringer zu sein; insbesondere ergaben die Untersuchungen von GERET und HAHN (1), daß die Proteolyse des Hefenpreßsaftes nicht, wie dies WILL (1) von derjenigen der lebenden Hefenzellen angegeben hatte, durch Sauerstoffmangel begünstigt wird. Es ergab sich im Gegenteil, daß Luft- oder Sauerstoffdurchleitung eher fördernd auf die Eiweißverdauung wirkte, daß ferner aber auch bei Durchleitung von Kohlensäure oder Wasserstoff die Proteolyse glatt vor sich ging, was bezüglich der Kohlensäure auch in praktischer Beziehung für die Gärprozesse von Wichtigkeit ist.

Schwache Antiseptika (Chloroform, Thymol, Toluol, 0,2 Proz. Salicylsäure, 0,1 Proz. Formaldehyd) beeinflussen die Endotryptase-Wirkung anscheinend nicht. Dagegen heben natürlich stark fällende Zusätze (3 Proz. Phenol, 0,1 Proz. Sublimat) die Verdauung auf, die im Gegensatze zu SCHÄR's Angaben über die Enzym-Wirkung auch durch 1 Proz. Blausäure nicht gehemmt wird. Neutralsalze (Natriumchlorid, Kaliumnitrat, Calciumchlorid) begünstigen selbst in konzentrierteren Lösungen, zufolge T. GROMOW (1) bis 5 Proz., die Proteolyse, während gesättigte Lösungen wieder stark hemmend wirken. Auch 50-proz. Glycerin- und Rohrzucker-Zusatz bewirkt eine starke Verminderung der Proteolyse und damit (s. S. 358) eine Konservierung nicht nur der Eiweißstoffe sondern auch der Alkoholase. T. GROMOW (1) hat diese Feststellungen von GERET und HAHN dahin ergänzt, daß nicht nur Glycerin und Rohrzucker sondern auch Mannit, Glucose, Milchzucker und Glycocoll auf die Proteolyse der in Wasser aufgeschwemmten Dauerhefe hemmend einwirken; bei der Saccharose macht sich ein hemmender Einfluß schon bei 5 Proz. Zusatz bemerkbar, bei 35 Proz. ist die Proteolyse fast aufgehoben. In isotonischen Lösungen übt die Saccharose einen stärker hemmenden Einfluß aus als Glycerin und Glycocoll; jedenfalls ist also hier die hemmende Wirkung nicht als ein rein physikalischer Prozeß aufzufassen.

Ein im Vakuum auf ein Drittel des Volumens eingedickter Preßsaft zeigte eine starke Verminderung der Selbstverdauung, und die gleiche Erscheinung tritt auf, wenn man die Dauerhefe nicht in Wasser suspendiert,

sondern zu einem dicken Brei anrührt. Ob hier, wie T. Gromow (1) annimmt, die Anhäufung der Stoffwechselprodukte das behindernde Moment darstellt, kann nicht als erwiesen gelten.

Auch der Einfluß des *Alkohols*, der ja in Hefenzuchten stets in größerer oder geringerer Menge vorhanden ist, hat praktische Bedeutung. Versuche von Geret und Hahn haben dargelegt, daß die Proteolyse des Hefenpreßsaftes bei Gegenwart von 5 Proz. Alkohol schwach gehemmt, bei 10—20 Proz. schon erheblich gemindert ist (von T. Gromow bestätigt) und durch 30 Proz. Alkoholzusatz aufgehoben wird. Man wird also bei der Wein- und Biergärung, selbst in vorgeschrittenen Stadien, noch kaum eine völlige Aufhebung der Endotryptasewirkung durch den Alkohol voraussetzen dürfen. Nach Iwanoff (1) wird die Proteolyse bei der Gärung nicht durch den Alkohol, dessen hemmende Wirkungen (s. S. 359) sich erst bei Konzentrationen von mehr als 4 Proz. bemerkbar machen, sondern durch andere flüchtige Nebenprodukte, Aldehyde und Ester (Fruchtäther) erheblich behindert. In reinen Nährlösungen erfahren die Eiweißstoffe nach Iwanoff bei der Hefengärung keine Zersetzung, aber in den gewöhnlichen vollständigen Nährlösungen, in denen alle physiologischen Prozesse in vollem Gange sind, kann, wie Iwanoff selbst feststellt, schon eine geringe Menge von sauren Phosphaten die hemmende Wirkung der Gärprodukte auf die Proteolyse vollständig aufheben, ja diese letztere beschleunigen.

Säuren begünstigen in schwacher Konzentration die Wirkung der Endotryptase. Das Optimum liegt bei einem Gehalt des Hefenpreßsaftes von 0,2 Proz. Salzsäure und einer äquimolekularen Menge Schwefelsäure, während Essigsäure in gleicher Konzentration noch günstiger zu wirken scheint. Borsäure (1 Proz.) oder Natriumborat (1 Proz.) wirken nicht hemmend auf die Proteolyse, während Borax (s. S. 135), sowie alle Alkalien, selbst in der Konzentration von 0,1—0,2 Proz., ja schon durch die Neutralisation des Preßsaftes die Proteolyse stark herabsetzen.

Die **Wirkung** der **Endotryptase** erstreckt sich nicht nur auf die Nucleine der Hefenzelle, sondern auch auf andere Eiweißstoffe. Schon Boullanger (1) und Beijerinck (1) hatten die Casein-Verdauung der Hefe festgestellt, Beijerinck hatte auch mit Gluten, Albumin und Fibrin das gleiche Resultat erhalten, das von Geret und Hahn (1) für Casein, Gluten-Casein und Albumin bestätigt werden konnte. Schütz (1) fand bei seinen Untersuchungen mit Preßhefe, daß die Endotryptase das Hefennuclein und Gelatine am stärksten angreift, während Euglobulin und Serumalbumin viel weniger stark zerlegt wurden, Pseudoglobulin in zwei von drei untersuchten Fällen überhaupt nicht.

Bezüglich der **Spaltungsprodukte**, die bei der Selbstverdauung der Hefe entstehen, sind die älteren Angaben nur mit einer gewissen Vorsicht zu verwerten, weil nicht immer aus den Publikationen mit Sicherheit zu entnehmen ist, ob die Hefenfäulnis durch Bakterien vollständig ausgeschlossen war, und weil ferner in einigen Fällen Verfahren zur Untersuchung angewandt wurden, die an sich eine Zersetzung der Eiweißkörper bedingen können. So fanden Nägeli und Loew (1) bei ihren Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung der Hefe 2 Proz. Peptone, die Loew noch in a-, b-, c-Pepton (Meissner) differenziert. Diese Ergebnisse hatte aber ein wässeriger Hefenauszug geliefert, der durch elfmaliges, langes Kochen gewonnen worden war, so daß Nägeli selbst die hydratisierende Wirkung des siedenden Wassers als möglich zugeben mußte. Nach Geret und Hahn (1) ist in dem bei 37° C ver-

dauten Hefenpreßsaft von Albumosen und Pepton nichts zu finden, ja selbst bei Zusatz von Albumosen und Pepton zum Preßsaft schwindet die Biuretreaktion bei höherer Temperatur rasch. Dagegen treten bei der durch Eisschranktemperatur verzögerten Preßsaftverdauung Albumosen, und zwar zum großen Teil Deuteroalbumosen, auf, während eigentliche Peptone im Sinne Kühne's nicht nachzuweisen waren. Da auch Fr. Kutscher (1) bei der Chloroformwasser-Digestion der Hefe — ein Vorgang, bei dem das Enzym nur allmählich aus den Zellen austritt und zur Wirkung kommt — Biuretreaktion 8—14 Tage lang auftreten sah, so wird man zugeben müssen, daß bei langsam verlaufenden Endotryptasewirkungen auch immer kleine Mengen von Albumosen gebildet werden können. Frühzeitig wurde man schon auf andere Spaltungsprodukte aufmerksam, die bei der Selbstverdauung der Hefe auftreten. So wies Liebig im Jahre 1868 auf das Auftreten von Leucin in der selbstgärenden Hefe hin, Béchamp fand im Jahre 1872 das Tyrosin unter den Spaltungsprodukten, und gleichzeitig beobachteten beide Forscher einen reichlichen Austritt von Phosphorsäure aus der Hefenzelle. Es folgen die Befunde Schützenberger's, der in dem wässerigen Extrakt aus selbstgärender Hefe neben Tyrosin und Leucin auch Butalanin, ferner Alloxurbasen, Carnin, Sarkin, Xanthin und Guanin fand. Schützenberger betrachtete alle diese Spaltungsprodukte als Derivate des Albumins. Durch Kossel's (1) und Salkowski's (1) Untersuchungen wurde dann festgestellt, daß die auftretende Phosphorsäure und die Alloxurbasen als Spaltungsprodukte der Nucleinsubstanzen der Hefenzelle zu betrachten sind, während das Leucin und das Tyrosin wahrscheinlich durch die Zerlegung anderer Proteinsubstanzen entstanden sind. Auch die Selbstverdauung des Hefenpreßsaftes bestätigte diese Resultate. Geret und Hahn fanden, daß im Hefenpreßsaft der größtenteils organisch gebundene Phosphor bei der Digestion zu vier Fünftel bis fünf Sechstel in Phosphorsäure übergeführt wird, und daß schon nach einstündiger Digestion bei 37° C der größte Teil des Phosphors in dieser Form nachgewiesen werden kann. Dagegen steigt die Menge der Schwefelsäure nur unwesentlich an. Die stickstoffhaltigen Substanzen des Hefenpreßsaftes werden dabei in der Weise zerlegt, daß am Schlusse der Selbstverdauung von dem Stickstoff der Verdauungsprodukte ungefähr 30 Proz. auf die Basen und 70 Proz. auf die Aminosäuren verteilt sind, im gleichen Verhältnis, wie diese Körper auch in dem vom Eiweiß befreiten frischen Preßsafte gefunden werden. Die Xanthinkörper, welche in geringer Menge (50—60 mg pro 100 ccm Preßsaft) auftreten, zeigen insoferne ein interessantes Verhalten, als sie unter normalen Umständen nach der Selbstverdauung des Preßsaftes noch in latenter Form vorhanden sind und nur durch Kochen mit Säuren offenkundig werden. Wahrscheinlich ist diese Latenz vornehmlich durch die Kohlensäure bedingt, welche infolge der Gärung im Preßsafte auftritt.

Die nähere Charakterisierung der einzelnen Spaltungsprodukte, insbesondere der basischen, hat Kutscher mit Hilfe der Kossel'schen Methoden erzielt. In einer neuerdings erschienenen Arbeit stellen Kutscher und Lohmann (1) folgende Reihe von Spaltungsprodukten auf, die sich auf Versuche mit in Toluolwasser suspendierter, selbstgärender Brauereihefe gründet: Guanin (reichlich), Adenin (reichlich), Xanthin (Spuren), Hypoxanthin (Spuren), Histidin, Leucin, Arginin, Tyrosin, Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure (bisher nicht nachgewiesen), Ammoniak (wenig). Shiga (1) hat neuerdings festgestellt, daß das

Xanthin bei der Digestion des Hefenpreßsaftes ständig zunimmt, das Guanin aber bei der Autolyse zersetzt wird, auch wenn es in freiem Zustande zugefügt wird, während Adenin und Hypoxanthin bald eine Abnahme, bald eine Zunahme erfahren. Das Arginin wird nach SHIGA 5 zum Teil durch ein im Hefenpreßsaft gefundenes Enzym „Arginase" in Harnstoff und Ornithin (α-δ-Diaminovaleriansäure) zerlegt, ein Vorgang, den KOSSEL und DAKIN (1) schon bei tierischen Organen beobachtet hatten.

Schließlich hat KUTSCHER als Spaltungsprodukt des Hefen-Lecithins noch Cholin nachweisen können. Damit ist auch die Annahme hinfällig, 10 daß das Cholin immer völlig aus der unvergorenen Flüssigkeit (Maische, Würze, Melasse, Most) stammen müsse. Der Befund von Cholin ist insoferne wichtig, als er zugleich eine Erklärung für das Auftreten des Glycerins abgeben könnte, das, wie auf S. 380 ausgeführt wurde, durch Zerfall von Lecithin in fette Säuren, Cholin und Glycerinphosphorsäure 15 entstehen könnte. Ob andere organische Basen, die man in vergorenen Flüssigkeiten bezw. ihren Destillaten (s. S. 395) aufgefunden hat, der Endotryptasenwirkung ihre Entstehung verdanken, muß zum mindesten zweifelhaft erscheinen. Dahin gehören die von BRÜCKE bereits im Jahre 1855 im Weißwein gefundene organische Base, das von E. LUDWIG (1) 20 im Jahre 1867 im Wein gefundene Trimethylamin, die von OSER (1) in gärender Rohrzuckerlösung, von LERMER (1) im Bier, von GUÉRIN (1) in Weißweinen gefundene alkaloidartige Base, das von KRÄMER und A. PINNER (1) gefundene Collidin und die von SCHRÖTTER (1) im Fuselöl (s. S. 391) einer Melassenbrennerei beobachteten, nach BRANDES und 25 STOEHR's (1) Befunden wahrscheinlich als Pyrazinderivate zu bezeichnenden Basen. Alle diese Befunde sind nicht sicher auf die Tätigkeit der Hefe zurückzuführen: zum Teil mögen andere Mikroorganismen hier eine Rolle spielen, zum Teil mögen solche Produkte erst durch die Siedehitze aus den restlichen Eiweißkörpern der vergorenen Flüssigkeiten ent- 30 stehen. Schon die geringe Menge von Ammoniak, die man bei der reinen Selbstverdauung der Hefe gefunden hat, läßt es zum mindesten nicht als wahrscheinlich erscheinen, daß eine erhebliche Bildung von flüchtigen Aminbasen stattfindet, die ja meist leicht Ammoniak abspalten.

Gerade diese Spaltungsprodukte ermöglichen nun aber auch eine 35 nähere **Charakterisierung** des **proteolytischen Hefenenzyms.** Sie stimmen, wie KUTSCHER und LOHMANN hervorheben, vollständig mit den von den genannten Autoren bei der Trypsinverdauung gefundenen überein. SALKOWSKI, sowie GERET und HAHN hatten schon früher das Enzym als ein tryptisches bezeichnet und den Nachweis der Monaminosäuren 40 als genügend für diese Charakterisierung erachtet. Es ist wohl trotz der Gleichheit der Spaltungsprodukte nicht anzunehmen, daß die Hefenendotryptase mit der Pankreastryptase identisch sei. Zwei wesentliche Unterschiede liegen vor: 1. Die Endotryptase der Hefe wird in ihrer Wirkung durch saure Reaktion entschieden begünstigt, durch 45 alkalische gehemmt, sie verhält sich also gerade umgekehrt wie Pankreastryptase. 2. Im Preßsaft treten bei der Selbstverdauung Körper, welche die Biuretreaktion geben, nur ganz vorübergehend oder gar nicht auf, und selbst bei Zusatz von Pepton und Albumosen verschwindet die Biuretreaktion schnell. Trotz dieser Unterschiede wird aber daran fest- 50 zuhalten sein, daß hier ein zu der Gruppe der Tryptasen gehöriges Enzym vorliegt, und zwar auf Grund der Spaltungsprodukte. Denn ob, wie LAWROW (1) behauptet, auch Peptasen, die durch saure Reaktion in ihrer Wirkung begünstigt werden, eine so weitgehende Zerlegung des

Eiweißmoleküls hervorrufen können, muß noch als zweifelhaft erscheinen, da bei LAWROW's Versuchen mit zerschnittenen Schweinemägen autolytische, von der eigentlichen Pepsinwirkung abzutrennende Prozesse nicht ausgeschlossen waren.

Nicht so einfach ist die praktisch wie theoretisch wichtige Frage 5 nach den **Bedingungen** der **Bildung** und **Wirkung** der Hefenendotryptase zu beantworten. WILL (1), der eine große Reihe von Hefenarten als Reinzuchten in Bierwürzegelatine untersuchte und bei 20° C eine Verflüssigung innerhalb 18—80 Tagen (im Stichkanal beginnend) beobachtete, stellte zunächst fest, daß allgemein die schneller verflüssigenden 10 Arten (*Mycoderma*- und *Willia*-Arten) auch sauerstoffbedürftiger sind. Mischte er das Impfmaterial mit der erwärmten und dadurch verflüssigten Gelatine, so sah er die Proteolyse in 7—55 Tagen beginnen, und zwar auch proportional dem Sauerstoffbedürfnis der betreffenden Art. Auf Grund dieser und anderer Beobachtungen, auf die hier des Näheren ein- 15 zugehen nicht der Platz ist, kam WILL zu dem Schlusse, daß die Luft direkt oder indirekt bei der Proteolyse durch die Hefen eine Rolle spielt, und zwar dadurch, daß ihre Gegenwart der Bildung eines proteolytischen Enzyms hinderlich ist oder gebildetes wieder zerstört. Nach WILL ist die Verflüssigung der Gelatine eine Funktion nicht langsam 20 absterbender und sich auflösender, sondern normaler Zellen, hervorgerufen durch Mangel an Nahrung, und zwar nicht nur Mangel an gelöster Substanz überhaupt, speziell stickstoffhaltiger, sondern auch an Sauerstoff. Während WILL tote Hefenzellen nur für eine ständige Begleiterscheinung der Proteolyse hält und im übrigen einen Zusammen- 25 hang zwischen Proteolyse und Zelltod negiert, nimmt BEIJERINCK (1) an, daß das Enzym nur aus solchen Hefenzellen stamme, die aus Mangel an Sauerstoff zugrunde gegangen sind. Daß der Sauerstoffmangel nicht das entscheidende Moment für die Bildung des Enzyms darstellt, konnten GERET und HAHN dadurch beweisen, daß frische Oberflächenkulturen 30 untergäriger Bierhefe, die auf Bierwürze-Agar gewachsen waren, einen stark verdauenden Preßsaft lieferten: hier hatte sicher kein Sauerstoffmangel bestanden. Ferner liefern auch ganz frische Hefenzellen von jedem Wachstumstadium nicht nur in den aus ihnen gewonnenen wässerigen Extrakten, sondern auch im frischen Preßsaft Leucin und andere Spal- 35 tungsprodukte, und zwar sind die Eiweißderivate in frischen Hefenzellen im gleichen Verhältnis auf Basen und Aminosäuren verteilt, wie in dem völlig verdauten Preßsaft. Proteolytisches Enzym oder vielleicht auch dessen Zymogen ist also unter allen Bedingungen in den Hefenzellen vorhanden, und es dient, wie KUTSCHER sagt, vermutlich hier als kon- 40 struierendes Enzym, d. h. es vermindert die von den proteolytischen Enzymen des Malzes vorbereiteten und in die Hefenzelle diffundierten stickstoffhaltigen Nährstoffe so, daß sie von der Hefenzelle zum Aufbau ihrer Leibessubstanz verwertet werden können: intracellulär ist also in jeder Hefenzelle das proteolytische Enzym vorhanden. 45

Die Frage nach den **Bedingungen** der **Ausscheidung** des Enzymes aus den Zellen bleibt also noch zu erörtern. Daß der Sauerstoffentzug auch hier nicht das entscheidende Moment darstellt, ist am einfachsten daraus zu entnehmen, daß beim Waschen und Auslaugen lebender Hefenzellen mit destilliertem Wasser und zwölfstündigem Verweilen der Hefen- 50 zellen am Boden des Gefäßes in das Waschwasser dieser sauerstoffhungrigen Hefe wohl invertierendes, aber kein proteolytisches Enzym übergeht. Dagegen beginnt der Prozeß der Enzymausscheidung und

Selbstverdauung dann, wenn die Hefe längere Zeit bei höherer Temperatur ohne stickstoffhaltige Nahrung bleibt; dann wird von dem Enzym die Leibessubstanz der hungernden Hefe selbst angegriffen, vermutlich vor allem die Zellmembran gelöst, und das Enzym wirkt nunmehr, wie
5 Kutscher sagt, als destruierendes. Freilich ist es nicht nötig, daß, wie Beijerinck annimmt, sämtliche enzymbildenden Zellen bereits abgestorben sind. Man kann sich sehr wohl vorstellen, daß das Absterben relativ weniger Zellen und das von ihnen abgegebene Enzym zu einer Veränderung des Nährmediums oder der Zellmembran der noch lebenden
10 Zellen führt, welche diese nunmehr zu einer Ausscheidung des Enzyms veranlaßt. So ist es auch vielleicht zu erklären, daß Will relativ wenige abgestorbene Zellen in den verflüssigten Gelatinekulturen fand.

Mit diesen Darlegungen steht völlig im Einklang, daß Kutscher in reinem Lagerbier die charakteristischen Abbauprodukte der Hefe nicht
15 nachweisen konnte. Denn während des eigentlichen Gärprozesses bei niederer Temperatur wird vermutlich die Zahl der absterbenden oder pathologisch veränderten Hefenzellen, da sie sich unter günstigsten Ernährungsbedingungen befinden, nur eine sehr kleine und damit der Austritt von Endotryptase oder von Spaltungsprodukten aus den Hefenzellen
20 in die gärende Flüssigkeit nur ein höchst beschränkter sein. Anders kann sich dagegen die Lage der Dinge gestalten, wenn entweder die Flüssigkeit lange Zeit mit der Satzhefe in Berührung bleibt, d. h. nicht rechtzeitig abgelassen wird, oder aber bei höherer Temperatur vergoren wird. In beiden Fällen erscheint eine Endotryptasewirkung oder Selbst-
25 verdauung der Hefe nicht ausgeschlossen, weil beide Momente — längere Berührung der Flüssigkeit mit der Satzhefe, höhere Temperatur — das Absterben der Hefenzellen und die Wirkung der Endotryptase begünstigen. Ob die Steigerung des Gehalts an Eiweißstoffen in einem Biere, das bei höherer Temperatur (20° C) vergoren wurde, wie sie von
30 Hantke dargetan wurde, hiermit in Zusammenhang steht, muß bei der energischen Wirkung der Endotryptase, die das Eiweiß rasch zu den Endprodukten führt, als fraglich erscheinen. Dagegen wird man K. Lintner (1) beipflichten müssen, der den in untergärigem Biere bei zu warmer Führung der Hauptgärung sich einstellenden sogen. warmen
35 Gärgeschmack (s. S. 106) derart gedeutet hat: der Geschmack des verdauten Hefenpreßsaftes erinnert auch hieran.

Wichtig ist ferner in praktischer Beziehung, daß die Alkoholase durch die Endotryptase zerstört wird (s. S. 360) und somit die Gärkraft der Hefe überall da leiden kann, wo auch nur ein Teil der Hefenzellen
40 abstirbt. Das wird natürlich besonders dann der Fall sein, wenn die Hefe unter ungünstigen Ernährungsbedingungen steht oder im Hungerzustande sich befindet, also ganz besonders z. B. beim Wässern und Waschen der Hefe in der Preßhefenfabrikation. Hier bleibt die Hefe, um sie von Treberteilchen zu befreien oder sie schichtenweise zu sor-
45 tieren, längere Zeit mit kaltem Wasser in Berührung, und in der Tat ist häufig genug eine „Schwächung“ der Hefe von den Fabrikanten beobachtet worden, die allerdings zumeist auf Bakterientätigkeit zurückgeführt und demgemäß durch antiseptische Zusätze zu verhindern gesucht wurde. Viel wahrscheinlicher ist hier der Verlust an Gärkraft
50 durch Endotryptasewirkung zu erklären, gegen welch letztere sich der Zusatz von Antisepticis als nutzlos erweisen würde. Diesem Einfluß der Endotryptase zu begegnen, wird schwierig sein. Sicherlich wird eine Abkürzung der Waschzeit durch verbesserten maschinellen Betrieb die

Endotryptasebildung hemmen und damit zur Konservierung beitragen können. Auch die namentlich in warmer Jahreszeit so schnell eintretende Zersetzung der fertigen Preßhefenstücke wird man nicht immer auf Bakterientätigkeit zurückführen dürfen, die häufig genug erst sekundär einsetzt, nachdem ihr bereits durch das Absterben von Hefenzellen und 5 Endotryptasewirkung der Weg geebnet ist. Man vergleiche darüber auch Bd. V, S. 106 u. 270.

Ergänzende Angaben über Proteolyse durch Hefenenzyme findet man in dem von der Hefenteig-Gärung handelnden Paragraphen des 25. Kapitels des Zweiten Bandes. 10

§ 100. Das Philothion.

Das schon auf S. 220 des Dritten Bandes in Kürze gekennzeichnete Philothion, welches seinen Namen nach seiner Fähigkeit erhalten hat, elementaren Schwefel in Schwefelwasserstoff überzuführen, ist von seinem Entdecker J. de Rey-Pailhade (7), dann im Jahre 1900 mit dem neuen 15 Namen **Hydrogenase** belegt worden. Die Reduktionstätigkeit dieses Hefenenzymes beschränkt sich, einer Bemerkung desselben Forschers (5) zufolge, nicht auf den etwa gebotenen Schwefel, sondern zieht auch den Sauerstoff in ihren Bereich; ein Auszug aus Hefe, der es enthält, büßt dadurch beim Stehen an der Luft die besagte Fähigkeit binnen wenigen 20 Tagen ein. Doch ist die Empfindlichkeit gegen jenes Gas nicht groß; denn das Philothion ist, wie A. Wróblewski (1) gezeigt hat, in dem bei Luftzutritt gewonnenen Hefenpreßsaft (s. S. 352) noch in wirkungsfähigem Zustande vorhanden. Auf die an den Enzymen allgemein beobachtete Eigenschaft, durch das Chamberland-Filter (s. Bd. I, S. 524) unter Um- 25 ständen ganz zurückgehalten zu werden, scheint das negative Ergebnis einer durch G. Cossettini (1) unternommenen Ueberprüfung der Angaben Rey-Pailhade's zurückzuführen zu sein.

Die Absonderung und Gewinnung in reinem Zustande ist bei dem Philothion bisher nicht gelungen; man kennt und kennzeichnet es bloß 30 durch seine Wirkungen. Es gehört in die Gruppe der Reduktasen (s. Bd. I, S. 259), von deren übrigen Gliedern, so z. B. der sogen. Jacquemase (s. S. 259), es sich durch das ihm eigentümliche Verhalten zu elementarem Schwefel unterscheidet. Ebenso wie diesen vermag es, wie Pozzi-Escot (2) dargetan hat, auch Selen und Phosphor in deren Wasserstoff- 35 verbindung überzuführen, jedoch nicht auch Tellur und Arsen. Freie salpetrige Säure wird zufolge Rey-Pailhade (8) durch Philothion bei 40° C sehr rasch, bei gewöhnlicher Temperatur langsamer zerstört. Verdünnte Salzsäure oder Schwefelsäure legen dessen Tätigkeit lahm. Dieses Enzym scheint übrigens nicht allein in den Zellen der *Saccharomyces*- 40 und *Torula*-Arten (s. S. 293) sondern auch, wie Rey-Pailhade (2 u. 4) bemerkt hat, in verschiedenen Tiergeweben und in keimenden Samen vorzukommen. In jenen ersteren wird es zufolge Pozzi-Escot (5) während der Zeit deren lebhaften Vermehrung zunächst zurückgehalten und erst dann durch Diffusion an den Nährboden abgegeben, wenn in diesem 45 die Gärung ihren Höhepunkt erreicht hat.

Abelous und Ribaut (1) hatten das Dasein des Philothions als solchen überhaupt bestritten und die für dieses charakteristische Bildung von Schwefelwasserstoff mit dem Hinweis darauf zu erklären versucht, daß viele Proteine leicht einen Teil ihres Schwefels in jener Bindungs- 50

art abspalten. Pozzi-Escot (7) hat aber dann festgestellt, daß die das Philothion enthaltenden Hefenauszüge ihr Vermögen zur Bildung reichlicher Mengen jenes Gases durch Kochen einbüßen, was bald darauf durch Rey-Pailhade (9) bestätigt wurde, und daß sehr stark wirksame Auszüge sogar schwefligsaure Salze zu reduzieren imstande sind. Die Hefen sollen zufolge Pozzi-Escot (6) an diesem Enzyme das Verteidigungsmittel gegen die Giftwirkung der schwefligen Säure besitzen, welche Annahme doch in Widerspruch zur knapp zuvor angegebenen Bildung dieses Giftes durch das Philothion steht. Wahrscheinlich ist die von letztgenanntem Forscher bekämpfte gegenteilige Behauptung Gimel's (1) richtig, welcher in der Oxydase das Schutzmittel erblickt und meint, daß eine an größere Gaben von schwefliger Säure gewöhnte Hefe (s. S. 333) mehr Oxydase bilde als vor der Angewöhnung.

Auf Grund der durch Cathcart und Hahn (1) gemachten Beobachtung, daß zur Nachweisung reduzierender Enzyme das Methylenblau (s. Bd. I, S. 590) ein empfindlicherer und rascher reagierender Indikator als Lackmus, Indigokarmin u. dgl. m. ist, hat M. Hahn (2) das Reduktionsvermögen des Hefenpreßsaftes genauer geprüft. Es schwindet in diesem, wenn er mit Toluolzusatz im Eisschrank aufbewahrt wird, innerhalb weniger Tage und geht durch einstündiges Halten des Saftes bei 55—60° C fast ganz verloren. Die Optimal-Temperatur für die Reduktion liegt bei 40° C, welcher Befund mit dem durch Pozzi-Escot (1) angegebenen (30 – 40° C) ziemlich gut übereinstimmt. Verdünnen des Preßsaftes mit Wasser verringert jenes Vermögen; Bouillon hingegen wirkt begünstigend. Am schnellsten verläuft die Reduktion in altem Preßsaft. Die weitere Beobachtung, daß zwischen der Gärwirkung und der Reduktionswirkung des Preßsaftes ein gewisser Parallelismus zu erkennen sei, erinnert an die durch J. Grüss vertretene Ansicht über die Rolle der Hydrogenase (Philothion) bei der Alkoholgärung (s. S. 376); der bei dieser vorübergehend entstehende Wasserstoff sei es, welcher reduzierend (auch auf elementaren Schwefel) wirke, und nicht das Philothion selbst und direkt.

Zufolge Pozzi-Escot (1) hemmen Salze von saurer Reaktion, ganz besonders Quecksilberchlorid und Silbernitrat die Reduktionswirkung dieses Enzymes am kräftigsten, die Nitrate sind etwas weniger schädlich, Chloroform und Säuren wirken verzögernd, Alkalien hingegen verstärken sie.

Eingehendere Untersuchungen über das Reduktionsvermögen der Hefen und dessen wirkende Ursachen werden nicht nur unsere Kenntnisse auf dem Gebiete der Enzymlehre mehren, sondern auch der Praxis der Gärungsgewerbe nützlich werden können. Den Gärungstechnikern und analytischen Chemikern ist das Auftreten von schwefliger Säure und von Schwefelwasserstoff in gärenden Mosten, Würzen und Maischen und deren Vorkommen in Wein, Bier und Spiritus schon zu einer Zeit bekannt gewesen, in welcher noch niemand von Reduktasen sprach. Die darüber vorliegenden Beobachtungen sollen in den nachfolgenden Zeilen zusammengestellt werden. Zuvor sei aber noch betont, daß die zukünftige Forschung vielleicht gut tun wird, mit der Möglichkeit zu rechnen, daß in den Hefen mehr als bloß ein einziges reduzierendes Enzym vorkommen könne. Die Annahme, daß die Entstehung der im Bereiche anorganischer Reaktion einander ausschließenden Verbindungen des Schwefels einmal mit dem Wasserstoff und das andere Mal mit dem Sauerstoff in den Zellen auf das Wirken je eines besonderen Enzymes zurückzuführen sei, ist wohl der Prüfung wert, und um so mehr, als bei einem anderen Elemente, nämlich dem Stickstoff bei der Nitrifikation, ähnliche Ver-

hältnisse, auch was die nicht zu unterschätzende Aenderung der Wertigkeit (Valenz) betrifft, zu finden sind.

Das Auftreten **schwefliger Säure** in gärender Bierwürze und das Vorkommen dieser Schwefelverbindung im Bier ist schon seit langem bekannt. Es ist früher allein auf den mit jenem Gase konservierten 5 Hopfen (s. Bd. I, S. 609) zurückgeführt worden. Auf Grund seiner Untersuchungen an einer großen Anzahl von verdachtfreien Bierproben schlug J. HERZ (1) im Jahre 1885 einen Gehalt von 13.7 mg Schwefeldioxyd im Liter als oberen Grenzwert vor, so daß eine Bierprobe mit höherem Gehalt als bestimmt mit Sulfit versetzt bezichtigt werden sollte. Dieser 10 kritische Grenzwert ist, nebenbei bemerkt, zu niedrig angesetzt, wie aus den Ergebnissen der von ED. JALOWETZ (1) vorgenommenen Prüfung böhmischer und Wiener Biere hervorgeht, in welchen bis 13.7 mg Schwefeldioxyd durch Destillation nachgewiesen werden konnten. Im Jahre 1889 hat dann FR. PFEIFER (1) dargetan, daß die schweflige Säure des Bieres 15 zum größten Teile nicht aus den Rohmaterialien stammt, sondern erst durch die Hefentätigkeit entsteht. Er hat das allmähliche Anwachsen dieses Reduktionsproduktes während der Biergärung verfolgt. Seine Befunde sind in nachfolgender Zusammenstellung wiedergegeben.

Schwefligsäure-Gehalt in Milligramm pro Liter:

	von Lagerbier:	von Abzugbier:	Desgl.:
Tropfsack-Würze	Spuren	Spuren	Spuren
Im Durchbruch, d. h. zu Beginn der Gärung	11,1	7,6	2,9
Beim Fassen, d. h. nach Schluß der Hauptgärung	11,7	8,8	3,7
Nach einmonatlichem Lagern im Lagerfaß	12,5	7,7	?
Beim Ausstoß, d. h. beim Austritt aus der Brauerei	?	9,6	4,7

In Rohrzuckerlösungen, welche mit den erforderlichen Nährsalzen (ein- 20 schließlich schwefelsauren Ammons) versehen, sterilisiert und dann mit Hefe beimpft worden waren, konnten nach Ablauf von fünf Tagen, als die Gärung fast zu Ende war, pro Liter 11,4 mg Schwefeldioxyd nachgewiesen werden. Zu einem ähnlichen, eine gegenteilige frühere Behauptung L. ROESLER's (1) widerlegenden Ergebnisse gelangte dann 25 B. HAAS (1) bei den durch ihn an gärenden Weinmosten angestellten Untersuchungen; jedoch war bei diesen die Mitwirkung von Bakterien leider nicht ausgeschlossen worden. Er fand in einem sieben Wochen alten, gärenden Weinmoste 49,4 mg schweflige Säure im Liter, zwei Monate darauf 57,6 mg. PFEIFER's Feststellungen sind durch die Beobachtungen 30 von J. KLAUDI und A. SVOBODA (1) bestätigt worden. Auch in Obstwein, und zwar in Aepfel- und Johannisbeerweinen, welche im Laboratorium bereitet und also gewiß nicht geschwefelt worden waren, fand ED. HOTTER (1) im Liter 4,5—4,8 mg schweflige Säure vor. Die während der Gärung entstandene, wie auch jene Menge schwefliger Säure, welche 35 durch das Schwefeln in den Wein gelangt ist, gehen dann während der Lagerung fast ganz in den gebundenen Zustand über, und zwar zum Teil in Sulfate, zum Teil in aldehydschweflige Säure, $CH_3 \cdot CH(OH)(SO_3H)$. Die Entstehung und das allmähliche Verschwinden, wie auch die Methoden zur chemisch-analytischen Bestimmung dieser an dem Weinbouquet mit- 40 beteiligten und der Gesundheit zufolge J. MARISCHLER (1) nicht abträglichen Verbindung hat zuerst M. RIPPER (1—3) eingehend studiert. Sein Befund, daß in flaschenreifen Weinen nur noch geringe Mengen freier schwefliger Säure (meist weniger als 20 mg im Liter) vorhanden sind, ist durch R. KAYSER (1) wie auch später durch W. SEIFERT (1) bestätigt 45 worden, welch letzterer Forscher einige Beobachtungen über die Mengen

an schwefliger Säure angestellt hat, welche unter den Verhältnissen der Praxis derart aufgenommen und gebunden werden. In dem gebundenen Zustande erhält sich die schweflige Säure, vorausgesetzt daß das Zutreten von Luft zur Flüssigkeit verhütet wird, recht lange; so ist wohl 5 die Angabe BUNGENER's (1) zu deuten, daß er in einem Bier, das bei 50° C pasteurisiert worden war, nach vier Monaten noch 11 mg Schwefeldioxyd vorgefunden habe. Ein Gehalt des Bieres oder Weines an schwefliger Säure wird, nebenbei bemerkt, das Ergebnis der Zuckerbestimmung mittelst FEHLING'scher Lösung beeinflussen, wie schon J. HERZ 10 erinnert hat. Eine vergleichende Untersuchung über die einzelnen Verfahren zur analytischen Bestimmung der schwefligen Säure hat L. MATHIEU (2) angestellt.

Auch das Auftreten von **Schwefelwasserstoff** und einigen verwandten Verbindungen im Verlaufe der Gärung von Bierwürze, Weinmost und 15 Spiritusmaischen ist schon seit vielen Jahren bekannt und gefürchtet. Im Wein kommt dadurch der sogen. Böcksergeschmack, oder Böckser kurzweg, zustande, über welchen man schon im Jahre 1847 eine Bemerkung bei LEUCHS (1), eingehendere Studien aber erst im Jahre 1869 bei NESSLER (1) findet, der feststellte, daß diese Erscheinung in einigen 20 Fällen bei Anwesenheit freien Schwefels im Wein bezw. Most auftritt, in anderen Fällen aber auch ohne solchen sich einstellt. Elementarer Schwefel als solcher kann ab und zu schon im Moste selbst vorhanden sein, von der Traube herstammend; denn der Rebstock wird ja zur Bekämpfung des Erregers des echten Mehltaues, des *Oidium Tuckeri* 25 (s. Bd. I, S. 211), mit Schwefelblumen bestäubt, und in Italien scheint man, wie aus einer Bemerkung bei SOSTEGNI und SANNINO (1) zu vermuten ist, hie und da den Most absichtlich mit Schwefel zu versetzen, um durch diesen das Kupfer auszufällen, welches durch das Bespritzen der Reben mit Bordeaux-Brühe (s. S. 127) auf die Trauben gelangt ist. 30 Elementarer Schwefel gerät aber auch auf die Weise in den Wein, daß beim sogen. Einbrennen der Fässer (s. Bd. I, S. 536) von dem entzündeten Schwefelfaden etwas Schwefel abtropft oder sublimiert. Auch in der gärenden Bierwürze tritt, wie W. WINDISCH (1) betont hat, ab und zu Schwefelwasserstoff auf. Von den beiden Arten von Krankheits- 35 erscheinungen, die man zusammenfassend als Burton-Stench (s. Bd. V, S. 205) bezeichnet hat, wird zufolge FREW (1) zwar die eine durch eine besondere Krankheitshefe hervorgerufen, die andere hingegen ist auf Bildung von Schwefelwasserstoff zurückzuführen. Zu dieser Erscheinung den Anlaß gebender freier Schwefel kann in die Würze schon durch 40 den Hopfen gelangen, in welchem man ihn nach O. OVERBECK (1) durch Verreiben der Probe mit frischer Bierhefe qualitativ mittelst darüber gehaltenen Bleipapiers (eines mit einer Lösung von Bleiacetat befeuchteten Streifens Filtrierpapier) nachweisen kann. Arsenik, welcher in England aus einem mit direkten Feuergasen gedarrten Malze in geringer Menge 45 in die Würze gelangt, wird, nebenbei bemerkt, zufolge NEWLANDS und LING (1) während der Biergärung weder zu Arsenwasserstoff reduziert noch auch durch den etwa entstehenden Schwefelwasserstoff ausgefällt. Durch eingehende Untersuchungen über das Auftreten des Böckser-geschmackes im Wein hat P. KULISCH (1) im Jahre 1895 festgestellt, 50 daß diese Erscheinung durch Zufügen von Schwefel zu gärendem Moste willkürlich hervorgerufen werden könne, und daß solcher Zusatz den Verlauf der Gärung beschleunigte. J. WORTMANN (1) und W. SEIFERT (1) haben dies dann bestätigen können; letzterer erklärte die Beschleunigung

als besonderen Fall der ganz allgemein eintretenden Förderung der Hefenvermehrung und Gärung durch Zusätze von fein verteilten festen Körpern, wie Trebern, Holzfasern, Asbest und Holzkohle.

Die Tatsache des Auftretens des Böcksers bei Anwesenheit von elementarem Schwefel ist durch die auf S. 447 gemachten Angaben über das Verhalten des Philothions zu freiem Schwefel im Grunde nun aufgeklärt und auch in der Praxis der Gärungsgewerbe verhältnismäßig leicht zu vermeiden. Heikler, weil nicht so leicht übersehbar und praktisch kaum zu beherrschen, ist die Sachlage aber in den schon durch Nessler abgesonderten anderen Fällen, in denen Schwefelwasserstoff in Abwesenheit von freiem Schwefel auftritt, also aus Sulfaten und anderen Schwefelverbindungen gebildet wird. Von Nessler's Erklärungsversuchen sei derjenige des Hinweises auf die von Schwefelwasserstoffbildung begleitete Fäulnis des Hefentrubes erwähnt, der aber in all jenen Fällen im Stich läßt, in denen Schwefelwasserstoff nicht erst im Lagerfaß sondern schon während der Hauptgärung sich bemerkbar macht, in der doch von Fäulnis des Gärerregers kaum die Rede sein kann. Die erste Bemerkung, daß lebhaft tätige Hefe fähig sei, dieses Gas aus Sulfaten zu bilden, wurde durch Crouzel (1) gemacht, dessen Versuche jedoch nicht für einwandfrei gelten konnten, weil er, wie Gay (1) betonte und er (2) selbst dann zugab, nicht mit Reinzuchten gearbeitet und also das Mitspiel von Bakterien nicht ausgeschlossen hatte. Von diesen letzteren aber gibt es, wie wir aus den Angaben auf S. 107 und 214 des Dritten Bandes wissen, sehr viele, welche das in Rede stehende Gas aus mancherlei Material abzuspalten vermögen.

Ueber zuverlässige Versuche mit Reinzuchten hat zuerst A. Nastukoff (1) im Jahre 1895 berichtet; die durch ihn geprüften Wein- und Bierhefen vermochten alle in Mineralsalz-Nährlösung, welche den Schwefel in Form von Magnesiumsulfat enthielt, Schwefelwasserstoff hervorzubringen. A. Osterwalder (1) gelangte dann im Jahre 1902 zu der Feststellung, daß die in Rede stehende Fähigkeit bei den einzelnen Hefenrassen verschieden groß ist, und daß es Rassen gibt, welche im Most nur bei Anwesenheit von freiem Schwefel, also nicht auch aus Sulfaten u. dgl. m., Schwefelwasserstoff bilden, während hingegen andere Rassen unter beiderlei Bedingungen reagieren. Zu diesen letzteren gehört z. B. die Hefe *Egnach* der Sammlung der Hefenreinzucht-Station in Wädensweil, die in einem Nährboden, welcher den Schwefel nur in gebundener Form enthielt, mehr Schwefelwasserstoff bildete als die Hefe *Steinberg* in einem gleichen, aber mit ein Gramm Schwefelpulver versetzten Nährboden. Osterwalder (2) hat zur Erkennung der Anwesenheit von Schwefelwasserstoff die Gärungsgase durch eine Lösung von Kupfersulfat hindurchstreichen lassen, welches Reagens aber wenig scharf ist. An dessen Statt ist dann durch R. Schander (1) das weit empfindlichere Bleipapier verwendet worden, mit welchem man zufolge Stagnitta-Balistreri (1) noch 0,3 mg jenes Gases mit Sicherheit zu erkennen vermag. Er hat so festgestellt, daß sämtliche der durch ihn geprüften Weinhefen (einschließlich *Sacch. apiculatus*) der Geisenheimer Versuchsstation, dann aber auch einige *Mycoderma*-Arten die Fähigkeit haben, den in der Nährlösung in gebundenem Zustande enthaltenen Schwefel in Form von Schwefelwasserstoff oder anderen flüchtigen Schwefelverbindungen abzuspalten, von welch letzteren das schon von M. Rubner (1) aus solcher Quelle bemerkte Mercaptan ($C_2H_5 \cdot SH$) durch L. Mathieu (1) in einem Weißwein mit deutlichem Knoblauchgeschmack vermutet wurde.

Die von H. Will und H. Wanderscheck (1) geprüften Hefen (zumeist Brauereihefen) konnten zu zwei Gruppen gesondert werden: die meisten brachten in Braunbierwürze Schwefelwasserstoff hervor, die anderen gaben in diesem Nährboden keine Reaktion.

5 Der Einfluß der Züchtungsbedingungen auf das Eintreten oder Ausbleiben der Schwefelwasserstoffbildung ist zuerst durch A. L. Stern (2) im Jahre 1899 betrachtet worden: In einer Nährlösung, welche Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat und Dextrose enthielt, brachte die darin gezüchtete Burton-Hefe nur dann Schwefelwasserstoff hervor, 10 wenn Asparagin als Stickstoffquelle geboten wurde, nicht aber auch dann, wenn an dessen statt Leucin, Tyrosin, Harnstoff oder Alloxan vorhanden war. R. Schander (1) hat dann in seinen Versuchen die Sulfate als bessere Schwefelquelle, im Vergleich zu organischen Schwefelverbindungen (Albumin, Pepton, Gelatine), erkannt und hat bemerkt, daß 15 in Mineralsalz-Nährlösungen, welche den Schwefel ausschließlich nur in elementarer Form (Pulver) enthielten, einige Zeit nach der Beimpfung plötzlich starke Zellvermehrung und Gärung und reichliche Entwicklung von Schwefelwasserstoff auftraten. Will und Wanderscheck (1) haben dann beobachtet, daß ein Zusatz von Pepton zu Würze die Ergiebigkeit 20 der Schwefelwasserstoffbildung mindert, daß aber auch ein Zusatz von Magnesiumsulfat oder von Gips entweder gar keine oder bloß eine geringe Steigerung der Reaktion gegenüber der in gleicher Würze ohne solchen Zusatz bemerkten hervorrief. Letztere Beobachtung ist für jene Brauereien von Bedeutsamkeit, welche ihrem Brauwasser Gips (s. S. 88) zufügen. 25 Die vergleichenden Versuche dieser zwei Forscher haben auch deutlich den Einfluß der (chemisch noch nicht ausreichend bestimmbaren) Beschaffenheit der Würze erkennen lassen. In einer der sieben verschiedenen Proben von gehopfter Braunbierwürze wurde durch Hefe *Saaz* viel Schwefelwasserstoff, durch Hefe *Frohberg* hingegen gar keiner entwickelt. 30 In einer zweiten Würze zeigte sich ein ähnliches Verhältnis zwischen Hefe *Froberg* und Hefe *Logos*, wie auch zwischen dem *Schizosaccharomyces Pombe*, welcher die stärkste Reaktion, und zwar in allen Würzeproben, zeigte, und dem *Schizos. octosporus*, welcher meist versagt hat. Noch deutlicher erwies sich jene Abhängigkeit in den Versuchen mit Mineral- 35 salz-Nährlösung, und zwar in der nach Hayduck. In dieser bildeten alle geprüften Hefen Schwefelwasserstoff, meist viel kräftiger als in Würze. Der schon durch Schander an Weinhefen geführte Nachweis, daß, entgegen Beijerinck's (2) Meinung, nicht nur Bakterien sondern auch Hefen fähig sind, Sulfate zu Schwefelwasserstoff zu reduzieren, ist so auch an 40 Bierhefen bestätigt worden. Den Mineralsalz-Nährlösungen kommen die Maischen der Melassenbrennereien in ihrer Beschaffenheit näher als Most oder Würze, und tatsächlich tritt auch, in Uebereinstimmung mit der zuvor erwähnten Beobachtung, in ihnen recht oft die Bildung von Schwefelwasserstoff ein und führt zu Betriebsstörungen und Verlusten, 45 für die man zu gern den Hefenzüchter verantwortlich zu machen geneigt ist.

Literatur

zum Kapitel Endotryptase und Philothion.

***Abelous,** A., und **Ribaut,** H., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1903, Bd. 137, S. 95 u. 268. ***Artari,** Alexander, (1) Abhandlungen d. naturforschenden Ges. zu Halle, 1897, Bd. 21, S. 113. ***Béchamp,** A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1865, Bd. 61, S. 689; 1872, Bd. 74, S. 184; 1874, Bd. 78, S. 645; 1879, Bd. 88, S. 866. ***Beijerinck,** M. W., (1)

Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1897, Bd. 3, S. 449 u. 521. — (2) Ebenda, 1900, Bd. 6, S. 194, Anm. ***Boullanger,** E., (1) Ann. Pasteur, 1897, Bd. 11, S. 720. ***Brandes,** P., und **Stoehr,** C., (1) J. f. prakt. Chem., 1896, Bd. 161, S. 501. ***Bungener,** (1) Moniteur scientifique, 1882, Bd. 24, S. 523 u. 829. ***Cathcart,** E., und **Hahn,** M., (1) Arch. f. Hyg., 1902, Bd. 44, S. 295. ***Cossettini,** G., (1) Bolletino chim. farm., 1901, Bd. 40, S. 75. ***Crouzel,** (1) Journ. de pharm. et de chimie, 1891, 5. sér., Bd. 23, S. 309. — (2) L'Union pharm., 1892, Bd. 33, S. 60. ***Duclaux,** E., (1) Thèses. Paris 1865, S. 44. ***Frew,** (1) Journ. Soc. chemical Industry, 1898, Bd. 17, S. 561. ***Gay,** F., (1) L'Union pharm., 1892, Bd. 33, S. 133. ***Geret,** Ludwig, und **Hahn,** Martin, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1898, Bd. 31, S. 202 u. 2335. ***Gimel,** G., (1) Bulletin de l'Assoc. des Chim. de sucr. et de distill., 1905, Bd. 23, S. 669. ***Gromow,** T., und **Grigoriew,** O., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1904, Bd. 42, S. 299. ***Guérin,** G., (1) Journal de pharmacie et de chimie, 1898, 6. sér., Bd 7, S. 323. ***Haas,** B., (1) Z. f. Nahrungsmittel-Unters. etc., 1890, Bd. 3, S. 241. ***Hahn,** Martin, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1898, Bd. 31, S. 200. — (2) Münchener med. Wochenschrift, 1902, S. 595. ***Hahn,** M., und **Geret,** L., (1) Z. f. Biologie, 1900, Bd. 40, S. 117. ***Herz,** Josef, (1) Repertorium d. analyt. Chemie, 1885, Bd. 5, S. 58. ***Hotter,** Eduard, (1) Vierter Jahresber. d. Pomolog. Landes-Versuchs- u. Samen-Kontroll-Station in Graz, für 1895—96, S. 26. ***Iwanoff,** Leonid, (1) Z. f. physiolog. Chem., 1904, Bd. 42, S. 464. ***Jalowetz,** Eduard, (1) Mitteilungen d. Oesterr. Versuchsstation f. Brauerei u. Mälzerei in Wien, 1902, Heft 10, S. 103. ***Kayser,** R., (1) Zeitschrift f. öffentl. Chemie, 1897, Bd. 3, S. 513. ***Klaudi,** Josef, und **Svoboda,** Anton, (1) Listy chemické, 1890; ref. in Kochs Jahresb., 1890, Bd. 1, S. 66. ***Kossel,** Albrecht, (1) Z. f. physiolog. Chem., 1880, Bd. 4, S. 290. ***Kossel,** A., und **Dakin,** H. D., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1904, Bd. 41, S. 321; Bd. 42, S. 181. ***Krämer,** G., und **Pinner,** A., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1869, Bd. 2, S. 401; 1870, Bd. 3, S. 75. ***Kulisch,** Paul, (1) Weinbau u. Weinhandel, 1895, Bd. 13, S. 2. ***Kutscher,** Fr., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1901, Bd. 32, S. 59 u. 419; 1902, Bd. 34, S. 517 u. 520. ***Kutscher,** Fr., und **Lohmann,** (1) Z. f. physiolog. Chem., 1903, Bd. 39, S. 159 u. 313. ***Lawrow,** D., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1901, Bd. 33, S. 312. ***Lermer,** J. C., (1) Dinglers Journ., 1867, Bd. 184, S. 159. ***Leuchs,** (1) Weinkunde, 1847. ***Liebig,** J. **von,** (1) Sitzungsber. d. Kgl. bayr. Akad. d. Wiss. in München, math.-phys. Cl., 1868 u. 1869, und Liebigs Ann., 1870, Bd. 153, S. 1. ***Lintner,** Karl, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1880, Bd. 3, S. 2; 1881, B. 4, S. 11. ***Ludwig,** Ernest, (1) Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wiss. in Wien, math.-naturw. Cl., 1867, Bd. 56, 2. Abt., S. 287. ***Marischler,** Julius, (1) Wiener klin. Wochenschrift, 1896, Bd. 9, S. 711. ***Mathieu,** L., (1) Revue de viticulture, 1898, Bd. 10, S. 155. — (2) Ref. in W. f. Brauerei, 1906, Bd. 23, S. 334. ***Nägeli,** C. **von,** und **Loew,** O., (1) J. f. prakt. Chem., 1878, Bd. 125, S. 403. ***Nastukoff,** A., (1) Comptes rend. de l'Ac., 1895, Bd. 121, S. 535. ***Nessler,** Julius, (1) Die Bereitung, Pflege u. Untersuchung d. Weines. 7. Aufl., Stuttgart 1898. ***Newlands,** R., und **Ling,** Arthur R., (1) J. federated Inst. Brewing, 1901, Bd. 7, S. 181. ***Oser,** Johann, (1) Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wiss. in Wien, math.-naturw. Cl., 1867, Bd. 56, 2. Abt., S. 489. ***Osterwalder,** A., (1) Landw. Jahrb. d. Schweiz, 1902, Bd. 16, S. 498. — (2) Weinbau u. Weinhandel, 1903, Bd. 5, S. 169. ***Overbeck,** O., (1) The Brewer's Journal, 1891, Nr. 307. ***Pasteur,** Louis, (1) Ann. de chim. et de phys., 1860, 3. sér., Bd. 58, S. 323 u. 401. ***Pfeifer,** Fr., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1889, Bd. 12, S. 345. ***Pozzi-Escot,** Emm., (1) Bulletin Soc. chimique, Paris, 1902, 3. sér., Bd. 27, S. 280. — (2) Ebenda, S. 346. — (3) Ebenda, S. 460. — (4) Ebenda, S. 459. — (5) Ebenda, S. 692. — (6) Bulletin de l'Assoc. des chim. de sucr. et de distill., 1906, Bd. 23, S. 1021. — (7) Comptes rend. de l'Ac., 1903, Bd. 137, S. 495. ***Rey-Pailhade,** J. **de,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1888, Bd. 106, S. 1683. — (2) Ebenda, 1888, Bd. 107, S. 43. — (3) Ebenda, 1894, Bd. 118, S. 201. — (4) Ebenda, 1895, Bd. 121, S. 1162. — (5) Bulletin Soc. chimique, Paris, 1890, 3. sér., Bd. 3, S. 171. — (6) Ebenda, 1897, 3. sér., Bd. 17, S. 756. — (7) Ebenda, 1900, 3. sér., Bd. 23, S. 666. — (8) Ebenda, 1902, 3. sér., Bd. 27, S. 6. — (9) Ebenda, 1904, 3. sér., Bd. 31, S. 987. — (10) Comptes rendus Soc. de Biologie, 1893, Bd. 49, S. 46. — (11) Ebenda, 1898, 10. sér., Bd. 5, S. 372. — (12) Bulletin Soc. chimique, Paris, 1906, 3. sér., Bd. 35, S. 1030. — (13) Ebenda, S. 1031. ***Ripper,** Maximilian, (1) Weinbau u. Weinhandel, 1890, Bd. 8, S. 168. — (2) J. f. prakt. Chem., 1892, Bd. 46, S. 428. — (3) Forschungsberichte ü. Lebensmittel etc., 1895, Bd. 2, S. 12 u. 35. ***Roesler,** L., (1) Mitteilungen d. chem.-physiol. Versuchsstation zu Klosterneuburg, 1885, Bd. 4, S. 9. ***Rubner,** M., (1) Arch. f. Hyg., 1893, Bd. 19, S. 136. ***Salkowski,** E., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1889, Bd. 13, S. 506. ***Schander,** Richard, (1) Jahresbericht d. Vereinigung d. Vertreter d. angew. Botanik pro 1903/4, Berlin 1905, S. 85. ***Schrötter,** Hugo, (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1879, Bd. 12, S. 1431. ***Schütz,** Julius, (1) Hofmeisters Beiträge z. chem. Physiologie u. Pathologie, 1903, Bd. 3, S. 433. ***Schützenberger,** P., (1) Die Gärungserscheinungen. Leipzig 1876. ***Seifert,** Wenzel, (1) Zeitschr.

f. d. landw. Versuchswesen in Oesterr., 1901, Bd. 4, S. 221. — (2) Ebenda, 1906, Bd. 9, S. 1019. *Shiga, K., (1) Z. f. physiolog. Chem., 1904, Bd. 42, S. 502. *Sostegni, Livio, und Sannino, Antonio, (1) Staz. sperim. agr. ital., 1890, Bd. 18, S. 434. *Stagnitta-Balistreri, (1) Arch. f. Hyg., 1893, Bd. 16, S. 10. *Stern, Arthur L., (1) Proceed. Chemical Society, 1898, Bd. 198, S. 182. — (2) J. federated Inst. Brewing, 1899, Bd. 5, S. 399. *Thénard, (1) Ann. de chimie, 1803, Bd. 46, S. 294. *Wehmer, Carl, (1) Chem.-Ztg., 1895, Bd. 19, S. 2038. *Will, Hermann, (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1898, Bd. 21, S. 139; 1901, Bd. 24, S. 113. *Will, H., und Wanderscheck, H., (1) Z. f. d. ges. Brauwesen, 1906, Bd. 29, S. 73. *Windisch, Wilhelm, (1) W. f. Brauerei, 1900, Bd. 17, S. 91. *Wortmann, Julius, (1) Bericht d. Kgl. Lehranstalt etc. in Geisenheim a. Rh. pro 1900/1901, S. 92. *Wróblewski, A., (1) Centralbl. f. Physiologie, 1898, Bd. 12, S. 697.

Siebenter Abschnitt.

Mucoraceengärungen.

Von Professor Dr. C. WEHMER.

(*Manuskript-Einlauf: 2. Jan. 1907.*)

21. Kapitel.

Morphologie und Systematik der Mucoraceen.

§ 101. Systematische Stellung und Gliederung der Mucoraceen.

Die Reihe der Zygomyceten, d. h. der Jochsporen (Zygosporen) bildenden Phycomyceten, gliedert sich, wie bereits auf S. 206 u. f. des Ersten Bandes auseinandergesetzt wurde, zunächst in zwei größere Familiengruppen (Ordnungen), die Mucorineen (*Mucorineae*) und die 5 Entomophthorineen (*Entomophthorineae*), von denen nur die erste für die technische Mykologie ein Interesse hat. Die Mucorineen wiederum umfassen eine Mehrzahl von Familien; nur die der Mucoraceen kommt von diesen schließlich in Frage. Mucoraceen und Mortierellaceen sind sporangienbildende Mucorineen-Familien gegenüber den an- 10 deren konidienbildenden Familien dieser Gruppe; von den Mortierellaceen verschieden sind jene aber als gymnospore gegenüber diesen als carpospore Familie, d. h. ihre Zygospore ist nicht mit einer Hülle versehen, sondern nackt, sie liegt nicht in einem Gehäuse. Auch besitzt das Sporangium der Mucoraceen durchweg eine Columella, 15 dem der Mortierellaceen fehlt eine solche. Für die Einreihung irgend einer unbekannten Form praktisch wichtig ist hiernach das Vorhandensein eines Sporangiums mit besonderer Columella, d. i. jener sich in die vielsporige Sporangiumkapsel vorwölbenden Stielendigung; denn Zygosporen treten weder bei allen Mucoraceen-Arten noch über- 20 haupt sehr regelmäßig auf, zeigen auch keineswegs stets besondere Merkmale, so daß wir uns zunächst ohne sie behelfen müssen.

Näheres über Zygospore, Sporangium und Columella ist bereits auf S. 183 u. f. des Ersten Bandes mitgeteilt worden. Hier sei nur nachgetragen, daß sich speziell mit dem Wert der Zygospore der Mucorineen 25 als Unterscheidungsmerkmal neuerdings VUILLEMIN (6) eingehender be-

schäftigt hat. Allgemeinere Bemerkungen zur Systematik aus neuerer Zeit findet man bei MATRUCHOT (1), BAINIER (1 u. 2), BESSEY (1), sowie besonders bei VUILLEMIN (6—9). Mit dem Bau der Zygosporenwand befaßte sich neuerdings gleichfalls letzterer (10), mit den Bildungs-5 bedingungen der Zygosporen neuerdings BLAKESLEE (1), NAMYSLOWSKI (1), DAUPHIN (2), früher KLEBS (2 u. 3), E. CHR. HANSEN (2), BREFELD (4—7) u. a. Eine größere Zahl zygosporenbildender Arten ist im Laufe der Zeit besonders von BAINIER (3—6), A. DE BARY (2), VAN TIEGHEM (4 u. 5), CORNU (1), FALCK (1) und VUILLEMIN (11) beschrieben worden: im ganzen zählt 10 BLAKESLEE (1) neuerdings 65 zygosporenbildende Mucorineen-Species auf. Mucorineen-Vertreter sind über die ganze Erde verbreitet. eine Mehrzahl kennt man aus Sibirien, China, Japan, Nordamerika, 18 Arten werden speziell für die finnische Flora durch HÄYRÉN (1) und zahlreiche aus Süd- und Mitteleuropa beschrieben.

15 Bezüglich der Systematik, Morphologie und Physiologie dieser Gruppe sei übrigens auch auf die betreffenden Kapitel der allgemeineren Werke von A. DE BARY (3) und ZOPF (2) sowie 20 die etwas neuere (1897) Bearbeitung von J. SCHROETER (1) in ENGLER-25 PRANTL's Natürlichen Pflanzenfamilien, zumal aber auf die Monographie A. FI-30 SCHER's (1) verwiesen.

Die **Mucoraceen** gliedern wir nach Beson-35 derheiten des Sporangiums (s. *Fig. 103*) in drei Unterfamilien: Piloboleen, 40 Thamnidieen und eigentliche Mucoreen. Bei den **Piloboleen** wird das mit 45 fester, oberseits cuticularisierter Wand versehene Sporangium meist als Ganzes 50 mit oder ohne Columella von den Trägern abgeworfen bezw. fortgeschleudert. während es bei den zwei anderen Gruppen sich im allgemeinen auf dem Träger selbst durch Zerfließen oder Zerbrechen der Wand unter Zurück-



Fig. 103. Sporangienträger der drei Mucoraceen-Unterfamilien (Thamnidieen, Piloboleen, Mucoreen).
1: *Thamnidium elegans* LINK mit einem Hauptsporangium (*h*) und zahlreichen Nebensporangien (Sporangiolen, *s*). — Vergr. ca. 130. Schematisiert, Stiel verkürzt gezeichnet.
2: *Pilobolus Kleinii* v. TIEGH. mit abschleuderbarem schwarzen Sporangium (*sp*) und subsporangioler Blase (*b*). — Vergr. ca. 30. Nach BAINIER.
3: *Mucor Mucedo* (L.) BREF., wie andere *Mucor*-Arten mit einerlei, nicht abschleuderbaren Sporangien. — Vergr. ca. 40. Stiel stark verkürzt gezeichnet. Origin.
Hier wie in den folgenden Abbildungen gibt der neben den Figuren stehende Strich die natürliche Größe an.



Fig. 104. Charakteristische Sporangienträger und Zygosporen von Mucoreen-Gattungen.

1: Sporodinia. Gabelig verzweigte Sporangienträger (*a*) und Zygosporenträger (*b*) von *Sp. grandis* LINK. — Vergr. ca. 8. Bei *sp* das stärker vergrößerte Sporangium. *a* Original, *b* nach BONORDEN.

2: Spinellus. Dorniges Luftmycel mit Zygosporen-Entwicklung von *Sp. fusiger* (LINK) v. TIEGH. — Vergr. ca. 50. Nach BAINIER.

3: Circinella. Sporangienträger mit steril bleibender Spitze von *C. umbellata* v. TIEGH. et LE MONN. — Vergr. ca. 50. Nach VAN TIEGHEM u. LE MONNIER.

4: Phycomyces. Zygospore mit dornigen Suspensoren (*s*) von *Ph. nitens* (AGARDH) KUNZE. — Vergr. ca. 30. Nach VAN TIEGHEM u. LE MONNIER.

5—6: Mucor. Zygospore mit glatten Suspensoren (*5*) von M. *erectus* BAIN. (Vergr. ca. 150) und Azygosporen an besonderen Trägern (*6*) von *M. tenuis* BAIN. — Nach BAINIER.

lassung der Columella öffnet (so bei den Mucoreen und den Hauptsporangien der Thamnidieen), in einigen Fällen freilich auch als Ganzes abfällt (columellalose Nebensporangien der Thamnidieen). Die Thamnidieen besitzen also stets Sporangien zweierlei Art (vielsporige Hauptsporangien neben wenigsporigen „Sporangiolen" auf dem gleichen Träger), die Mucoreen dagegen in der Regel einerlei Sporangien gleicher Art, wenn auch nicht immer ganz gleicher Größe. Die beiden bekanntesten Vertreter der beiden hier nur kurz zu berührenden Unterfamilien sind der mistbewohnende *Pilobolus crystallinus*, welcher seine schwarzen Sporangien auf weite Entfernungen fortschleudert, und das im Habitus den Mucor-Rasen sehr ähnliche, gleichfalls auf Pferdedünger u. a. auftretende *Thamnidium elegans*, welches leicht auf den üblichen Substraten kultiviert werden kann.

So gut wie ausschließlich hat uns hier die Unterfamilie der Mucoreen zu beschäftigen; sie umfaßt wieder eine große Zahl von Gattungen, die teils allgemeiner, größtenteils aber minder bekannt und seltener sind; zu ersteren gehören die Genera *Mucor*, *Rhizopus*, *Phycomyces*, *Sporodinia*, zu letzteren *Circinella*, *Pirella*, *Absidia*, *Spinellus* und andere. Die Systematik der Mucoreen befindet sich noch in vollem Fluß, so daß sich da gegen frühere Zusammenstellungen mancherlei geändert hat, zum Teil auf Grund neuer Beobachtungen, zum Teil infolge veränderter Einschätzung schon früher bekannter Merkmale. Zu den im Jahre 1892 von Alfred Fischer (1) in seiner wertvollen Bearbeitung der Phycomyceten — der einzigen vollständigeren Zusammenstellung und genauen Beschreibung dieser Pilze bis heute — aufgeführten acht Gattungen sind im Verlauf allein der letzten Jahre ebensoviel neue hinzugekommen (s. S. 459), und gutenteils sind diese gerade aus der wichtigen Gattung *Mucor* abgezweigt worden oder stehen ihr doch nahe.

Die unterscheidenden Gattungsmerkmale bei den Mucoreen liefert vorzugsweise der Sporangienträger (s. *Fig. 104*) mit Sporangium; in zunehmendem Maße sucht man, — vergl. z. B. Vuillemin (10) — richtigerweise auch die Zygospore heranzuziehen, ohne damit allein freilich schon aus dem oben erwähnten Grunde zu einer ausreichenden Charakterisierung zu gelangen. Wir übergehen hier grundsätzlich eine sich in fruchtlose Spekulationen verlierende Erörterung etwaiger verwandschaftlicher Beziehungen und halten uns lediglich an die Tatsachen. Die von Fischer (1) in seinen „Phycomycetes" gegebene, in einzelnen Teilen unseren heutigen Kenntnissen entsprechend noch zu modifizierende Tabelle mag das Verhältnis der verschiedenen damals bekannten Gattungen zueinander erläutern, nur die Hauptpunkte seien davon kurz wiedergegeben:

I. Arten ohne besondere Ausläufer:

A) Sporangienträger unverzweigt oder verzweigt, doch nie gabelig, Zygosporen am Mycel, meist nicht an besonderen Trägern:

1. Mycel in und auf dem Substrat gleich gebaut, Zygosporen im Substrat:
   a) Suspensoren ohne Dornen; Sporangienträger hell bis graubraun:
      α) Sporangienträger unverzweigt oder verzweigt, stets mit Endsporangium; Sporangienwand zerfließlich oder zerbrechlich . *Mucor*
      β) Sporangienträger verzweigt, ohne Endsporangium, Sporangien nickend, ihre Membran nie zerfließlich:
         x) Sporangien kuglig . . . . *Circinella*
         xx) Sporangien birnförmig . . . . *Pirella*
   b) Suspensoren dornig. Sporangienträger stets unverzweigt, sonst wie bei Mucor, jedoch grünlich oder olivfarben . . . *Phycomyces*
2. Mycel verschieden, Luftmycel braun, dornig, an ihm die Zygosporen, Substratmycel farblos . . . . *Spinellus*

B) Sporangienträger gabelig verzweigt, Zygosporen an besonderen aufrechten gleichfalls gabligen Trägern . . . . . *Sporodinia*

II. Arten mit besonderen, Rhizoiden tragenden Ausläufern (Stolonen):

A) Sporangienträger vorzugsweise an den Ausläuferknoten, Suspensoren ohne Dornen, Zygosporen nackt . . . . . . *Rhizopus*

B) Sporangienträger nur auf dem Scheitel der bogigen Ausläuferinternodien, Suspensoren mit Dornen, Zygosporen davon eingehüllt . . . . *Absidia*

Für die technische Mykologie kommen hiervon so gut wie ausschließlich Arten der Gattungen *Mucor* und *Rhizopus* in Betracht, auch die meist später aufgestellten neuen Gattungen, welche dieser Tabelle noch einzureihen wären, sind technisch bislang bedeutungslos, sie mögen hier deshalb ohne Kommentar unter Verweis auf die Diagnosen aufgezählt werden: *Actinomucor* SCHOSTAKOWITSCH (4), *Rhizomucor* LUCET et COSTANTIN (1), *Lichtheimia* VUILLEMIN (12), *Proabsidia* VUILLEMIN (6), *Parasitella* BAINIER (1), *Zygorhynchus* VUILLEMIN (6), *Glomerula* BAINIER (1), *Pseudo-Absidia* BAINIER (1). Bekannter sind von diesen nur wenige: *Zygorhynchus*, gleichwie *Proabsidia* auf Grund der geschnäbelten Zygosporen von *Mucor* abgetrennt und auf *Mucor heterogamus* VUILLEM. (= *Zygorhynchus heterogamus* VUILLEM.) hin aufgestellt; eine zweite zu ihr gehörige Species ist *Z. Moelleri* VUILLEM. Als *Lichtheimia corymbifera* (COHN) VUILLEM. ist der zuerst von LICHTHEIM (1) beschriebene *Mucor corymbifer* COHN schon auf Grund seiner abweichenden Columella mit Recht in eine neue Gattung versetzt worden. Unter die zweite Abteilung (mit Ausläufern und Rhizoiden) fallen von den genannten: *Actinomucor*, *Rhizomucor* (Subgenus), die Absidien, auch *Mycocladus* BEAUVERIE.

Wo weiter unten die kurze Aufnennung einer diesen neuen Gattungen unterstellten Arten erforderlich war, ist auch der alte bekanntere Name noch beibehalten und sie einfachheitshalber bei *Mucor* oder *Rhizopus* abgehandelt worden; selbstverständlich soll damit nichts gegen die systematische Berechtigung der neuen Genera gesagt sein. Keinenfalls darf man Fortschritte in der Gliederung des Systems völlig ignorieren und in der Literatur, wie das gelegentlich geschieht, einfach die alten Speciesnamen, ohne Hinweis auf die stattgehabte Aenderung, weiterführen. So ist z. B. die noch immer übliche kommentarlose Aufzählung des „*Mucor corymbifer* COHN“ mit Recht zu beanstanden.

In einer Gattung *Chlamydomucor* pflegt man auch heute noch mucorverdächtige Arten zu setzen, von denen keine Sporangien bekannt sind; man macht also mangels eines Bessern den Besitz von Chlamydosporen (Gemmen) zum Gattungsmerkmal. Es handelt sich da natürlich nur um ein provisorisches Unterbringen von ihrer eigentlichen systematischen Stellung nach unbekannten Pilzen. Das sind natürlich weder notwendig sterile noch unbedingt mucoreenartige Pilzformen. Hierher gehören z. B. der *Chl. Oryzae* (s. bei *Rhizopus Oryzae*), sowie der dubiose *Chl. casei* (ohne Beschreibung). Der frühere *Chl. racemosus* ist *Mucor racemosus* (s. bei diesem).

§ 102. Die Gattungen Mucor und Rhizopus.

Diese zwei wichtigen Gattungen haben wir hier zunächst kurz zu charakterisieren und morphologisch etwas näher zu betrachten. Beide

entwickeln ein hinsichtlich des feineren Baues jedoch verschiedenes Sporangium, nur die letztere (*Rhizopus*) erzeugt ein sogen. „Luftmycel" mit Rhizoiden; ohne durchgreifende Unterschiede sind die Zygosporen, dagegen anscheinend die Sporangien-Sporen.

5 Die **Gattung Mucor,** die als solche durch P. A. MICHELI im Jahre 1729 aufgestellt wurde, ist gekennzeichnet durch ihre stets mit Endsporangium abschließenden einfachen oder verzweigten Sporenträger, die nicht-aufsitzende Columella, die zerfließliche oder brüchige Sporangiumwand, fehlendes Luftmycel, dornenlose Suspensoren (gegen-10 über *Phycomyces*) der fast durchweg im Substrat entstehenden Zygosporen. Die Sporangienträger sind nie gablig oder wirtelig verzweigt (so bei *Sporodinia* bezw. *Rhizopus*), in der Farbe gewöhnlich weißgrau, nicht braunschwarz wie bei *Rhizopus* oder olivfarben wie bei *Phycomyces*; ausnahmslos ist das Sporangium kuglig, oder doch kaum wahrnehmbar 15 von der Kugelform abweichend, schwach abgeplattet, (dagegen birnförmig bei *Pirella*). Gegenüber *Rhizopus* und diesem nahestehende Gattungen fehlen vor allem die Ausläufer (Stolonen) sowie die Apophyse, und das faltige Epispor. Ueber die Deutung der Ausläufer vergleiche man jedoch die Bemerkung auf S. 465.

20 Das Sporangium, für welches VUILLEMIN den Namen Sporocyste verwendet wissen will, ist hinsichtlich Entstehung und Bau bereits auf S. 186 des Ersten Bandes besprochen worden. Außer dem aus stets einzelligen zahlreichen Sporen bestehenden Inhalt sind wesentliche Teile desselben die Wand und die Columella. Das Mucorsporangium 25 ist gewöhnlich hell in der Farbe (gelblich, orange bis graubraun, selten braunschwarz), aufrecht, d. h. nicht nickend, mit transparenter oder undurchsichtiger, glatter oder feinstachliger Wand; die dicht beieinander stehenden, sehr kurzen Nädelchen gelten als Calciumoxalat. Oft zerfließt die Wand bereits bei bloßer Berührung (stets bei jüngeren Exemplaren), 30 in anderen Fällen erst in Wasser oder selbst dann nicht (gewöhnlich bei alten längst reifen Köpfen), über ihre Chemie scheinen Ermittlungen bislang nicht angestellt worden zu sein. Die meist glatte und farblose oder doch nur leicht gefärbte Columella, unterhalb deren bauchiger Erweiterung sich die Sporangienmembran ansetzt, zeigt hier nach dem 35 Zerfall derselben mehrfach noch einen mehr oder minder umfangreichen Rest der Sporangiumwand (Kragenrest, Basalkragen), der in den Diagnosen eine gewisse Rolle spielt. Nach den Beziehungen der Columella zum Stiel sowie zur Sporangiumwand machte VUILLEMIN (4) eine Dreiteilung der Gattung, auf die hier nur kurz hingewiesen sei. Die Form 40 der Columella ist vorwiegend kuglig bis oval, auch verkehrt eiförmig, birnförmig, cylindrisch, meist glatt, in seltenen Fällen mit dornartigen Ausstülpungen (*M. spinosus* = *M. plumbeus*).

Die fast durchweg in großer Zahl im Sporangium vorhandenen Sporen sind nie eckig, sondern stets abgerundet, gewöhnlich gestreckt 45 (ellipsoidisch, bohnenförmig, bis zylindrisch), seltener streng kuglig (*M. plumbeus*, *M. corymbosus*, *M. globosus*, *M. heterogamus*, *M. pusillus*), bisweilen sehr unregelmäßig in der Form (*M. heterosporus*), fast stets hell und glatt, selten fein bestachelt (*M. plumbeus*, *M. ambiguus*), nie mit Leisten oder Falten versehen (vergl. *Rhizopus*!). Leider schwankt Form 50 wie Größe selbst innerhalb desselben Sporangiums oft außerordentlich, so daß diese Organe hier bei weitem nicht denselben diagnostischen Wert besitzen wie z. B. die Konidien der Aspergillaceen, jedenfalls ihre Maße nur mit Vorsicht herangezogen werden können.

Die Membranen der vegetativen Hyphen wie der Sporangienträger sind meist farblos, selten gefärbt und dann schwach graubraun (vergl. *Rhizopus*!). Der Zellinhalt ist vielfach gelb bis gelbrot, infolge eines an Fettropfen gebundenen Pigmentes.

Die Zygosporen der Gattung *Mucor* — von ca. 25 Species werden solche angegeben — sind mehr oder minder kuglig, mit warziger Oberfläche, meist braun gefärbt, ohne Hülle, ihre beiden Suspensoren ohne besondere Auswüchse, der Durchmesser liegt gewöhnlich erheblich unter 1 mm. Allgemeines über diese Organe ist bereits auf S. 185 des Ersten Bandes, einzelnes auch im vorigen Paragraphen mitgeteilt worden. Nur ausnahmsweise entstehen sie oberhalb des Substrats an besonderen Trägern (*M. tenuis*), sonst im Substrat selbst, auch nicht notwendig durch Verwachsen zweier Hyphen (Kopulation), sondern selbst direkt aus einem einzigen Hyphenzweig (*M. tenuis*, s. *Fig. 104*), dann Azygosporen genannt. Bemerkenswerte Beiträge zu dem schon früher wiederholt diskutierten Thema der Zygosporenbildung brachte neuerdings Blakeslee (1), indem er im Jahre 1904 für mehrere Arten feststellte, daß hier ihre Entstehung an das Vorhandensein zweier, aus verschiedenen Sporen hervorgegangenen Mycelien gebunden ist (heterothallische Formen: *M. Mucedo* u. a. gegenüber homothallischen Arten: *Mucor I* und *II*, *Sporodinia* u. a.); bei diesem Forscher findet man auch eine genaue Darstellung der früheren Literatur sowie Aufzählung der zygosporenbildenden Arten überhaupt. Man vergleiche dazu die Mitteilungen Swingle's (1) und besonders die neueste Veröffentlichung von Namyslowski (1), beide allerdings sich auf *Rhizopus* beziehend.

Bei vielen Arten der Gattung *Mucor* — freilich nicht auf diese beschränkt — findet man endlich eigenartige, unter sehr verschiedenen Namen in der Literatur gehende Gebilde zweierlei Art: Chlamydosporen und Kugelzellen, wie man letztere ohne morphologische Spekulationen und einfach den Tatsachen folgend wohl am zweckmäßigsten benennt. Man vergleiche dazu die von der hier vertretenen Auffassung etwas abweichenden Darlegungen auf S. 195 u. f. des Ersten Bandes. Diese beiden Gebilde (s. *Fig. 105*) sind ihrem Wesen nach ganz verschiedener Art, auch schon wiederholt Objekt eingehender Diskussionen gewesen. J. Schroeter (1) macht beide zusammen einfach als „Cysten“ ab.

Chlamydosporen (Gemmen, früher auch Brutzellen genannt) sind innerhalb des Thallus entstehende einzellige Organe von Sporencharakter, also Ruhestadien (Dauerorgane), mit meist derberer Wand und dichterem, stark lichtbrechendem Inhalt, die unter geeigneten Keimungsbedingungen sich zu neuen Mycelien entwickeln. Sie entstehen durch Kontraktion des Plasmas innerhalb der Hyphen unter Neubildung einer besonderen, meist dicken Haut, liegen also in den entleerten Fäden vereinzelt oder auch reihenweis und ohne an eine bestimmte Form gebunden zu sein (oval, kuglig, langgestreckt, unregelmäßig) hintereinander. Innerhalb wie außerhalb des Substrats, im Mycel wie im Sporenträger findet man sie; sie haben also endogene, meist intercalare Entstehung. Es sind, wenn man will, normale Bildungen, d. h. unter normalen Verhältnissen (Lebensbedingungen) entstehend, was wenigstens für die „Kugelzellen“ der Mucorineen nicht gilt.

Kugelzellen (Oidien, Reihengemmen, Sproßgemmen, grosses cellules sphériques der französischen Forscher) entstehen durch Zerfall der Hyphen nach voraufgegangener reichlicher Querwandbildung, also wie die Oidien bei *Oidium lactis*, *Endomyces* und anderen Hyphenpilzen. Die

einzelligen Teilstücke bleiben zunächst im Verbande oder zerfallen unter Abrundung und oft starker Volumvergrößerung; meist betrifft der Vorgang jüngere, noch wachsende Hyphen, welche damit also ihr Längenwachstum einstellen, das durch einseitig intercalares Wachstum ersetzt wird. Entstehung also durch Aufspaltung, schizogen. Ihrer Art nach sind sie aber nicht normale Bildungen (reichliche Septenbildung bei Mucorineen, also Phycomyceten, ist keine normale Erscheinung), sondern sie entstehen unter irgend welchen ungünstigen Einflüssen, so z. B. bei beginnendem Sauerstoffmangel, gewissermaßen als etwas Pathologisches, jedenfalls auf einen ganz bestimmten nachteiligen Reiz hin (*M. javanicus*, *M. racemosus*, *M. circinelloides* u. a.), wobei übrigens die Empfindlichkeit des Mycels spezifisch verschieden ist (*M. Mucedo* z. B. reagiert nicht). Wie jedes Hyphenstück, so können natürlich auch die entstandenen, stets innerhalb oder am Boden der Flüssigkeit vorkommenden Kugelzellen zu neuen Fäden auswachsen, sich also wie Sporen verhalten. Notwendig ist das nicht, ihr Wachstum kann sich auf bloße Volumenvergrößerung oder einseitiges Dickenwachstum der Membran beschränken: gestaltlich können sie damit kugligen Gemmen ähnlich werden, von denen sie sich aber meist auch durch sofortiges Wiederauskeimen unterscheiden. Sie haben im allgemeinen nicht Charakter und Aussehen von Ruhestadien sondern den einzelliger Vegetationsorgane, bezw. vegetativer Zellen. Von ihnen kommen wir zu dem (hiermit in Einklang stehenden) Begriff der „Kugelhefe“.

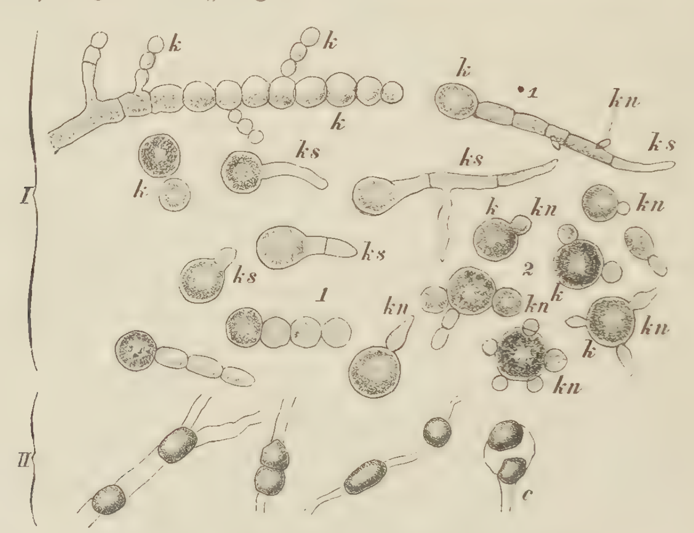


Fig. 105. Kugelzellen, Kugelhefe und Gemmen.
I: Kugelzellbildung bei *Mucor javanicus* Wehm. im Gärungssaccharometer. *1*: Auswachsen zu wieder zerfallenden Keimschläuchen, *2*: Knospenbildung (Kugelhefe). *k* Kugelzellen, *ks* Keimschlauch, *kn* Knospen. — Vergr. ca. 300.
II: Gemmenbildung bei *Mucor plumbeus* Bon. (= *M. spinosus* v. Tiegh.) in Hyphen und Columella (*c*). — Vergr. ca. 250.
I: nach Wehmer, *II*: Origin.

Zu Kugelhefe (Mucorhefe) werden unsere Kugelzellen, wenn sie statt hyphenbildender Keimschläuche (die freilich gewöhnlich alsbald wieder durch Querwandbildung und Aufspaltung zu kleinen Kugelzellen werden) nur eine kurze Knospe treiben; die Keimschlauchbildung

reduziert sich hier auf eine Sprossung, welche sich an der gleichen Mutterzelle an verschiedenen Stellen wiederholen kann, doch quantitativ nicht entfernt mit der Saccharomyceten-Knospung verglichen werden kann. Ob Hyphen oder nur kurze Knospen aus der Kugelzelle hervorgehen, darüber entscheiden in übrigens geeigneter Nährlösung (Zucker) allein wieder die Bedingungen und in erster Linie Fehlen oder Vorhandensein von Luftsauerstoff. Die Knospung ist hier offenbar der Anfang vom Ende, richtiger der letzte Entwicklungsversuch. Sichere Beobachtungen über ein Weitersprossen der Knospe erster Generation liegen bislang kaum vor. Die Kugelhefe sammelt sich spärlich am Boden des Kolbens, reichlich beobachtet man sie z. B. bei *M. javanicus*, spärlicher bei *M. racemosus* u. a., indes Kugelzellen bei anderen Arten (*M. Mucedo* z. B.) ganz fehlen. Entgegen den früheren Angaben steht sie mit der gleichzeitigen Alkoholgärung in keinem Kausalzusammenhang (s. 22. Kap.). Im allgemeinen legt die Literatur auf diese physiologisch immerhin interessanten Gebilde ein etwas zu großes Gewicht. Auch Sporen sollen Kugelhefe durch direkte Knospung, welche man übrigens auch gelegentlich an Mycelien beobachtet, liefern können.

Historisch sei nachgetragen, daß Kugelzellen wohl zuerst im Jahre 1838 von Berkeley gesehen worden sind, Kugelhefe erwähnt zuerst 1857 Bail (1). Weiterhin hat sich dann eine große Zahl von Forschern mit diesen beiden Entwicklungsformen beschäftigt, so Reess (1), A. de Bary (1), Pasteur (1), Brefeld (8), E. Chr. Hansen (2), Klebs (1), und die morphologische Deutung so insbesondere Brefeld — wie auch die Bildungsbedingungen diskutiert. Die hier gegebene Darstellung fußt im wesentlichen auf neueren eigenen Feststellungen, insbesondere an *M. javanicus*, *M. racemosus*, *M. spinosus*, *M. Mucedo*, *M. Rouxii*; vergl. Wehmer (7). Die Benennung „Kugelzellen“ scheint zuerst von A. Fischer (1) konsequent verwendet worden zu sein; sie ist fraglos sehr bezeichnend und soll auch hier neben dem kurzen Ausdruck „Gemmen“ für Chlamydosporen durchweg benutzt werden. Weitere Angaben über Kugelhefe und Gärung findet man im folgenden Kapitel. Mit spärlicher, bezw. reichlicher Ernährung die Entstehung von Gemmen bezw. Kugelzellen in Verbindung zu bringen, wie dies F. von Tavel (1) tut, liegt kein Grund vor; schon Schützenberger (1) im Jahre 1874 und A. de Bary (3) im Jahre 1884 wiesen darauf hin, daß Kugelzellen bei abgesperrtem Sauerstoffzutritt in gärfähigen Zuckerlösungen erscheinen, diese Ansicht ist auch nie aufgegeben oder gar erschüttert worden. Auf die mancherlei unzutreffenden Angaben unserer Lehrbücher kann hier nicht eingegangen werden, selbst gärungsphysiologische Bücher stellen diese Verhältnisse nicht immer richtig dar. Man vergleiche beispielsweise, um nur eins der bekannteren botanischen Bücher zu nennen, die Darstellung in Prantl-Pax, Botanik, 12. Aufl., 1904, S. 208.

Die Bildung einer echten saccharomycesähnlichen Alkoholhefe ist von Mucorineen überhaupt bislang nicht bekannt. Wo derartiges angegeben wurde — so neuerdings noch von Winkler (1) — fehlt der Beweis für eine genetische Zusammengehörigkeit; es liegen, wie sich aus der ganzen Darstellung bei letzterem ergibt, offenbar Täuschungen durch in die Kulturen gelangte Hefenzellen (*Saccharomyces*) vor.

Je nach dem Durchmesser der in Kugelzellen zerfallenden Hyphen variiert die Größe dieser außerordentlich, so daß man im gleichen Präparat große neben sehr kleinen in allen Uebergangsstadien findet; derartige Bilder sind leicht mit solchen zu verwechseln, die durch wirkliche

Sprossung entstehen, also mit Kugelhefenbildung; man vergleiche dazu WEHMER (3 u. 8), der daraufhin anfänglich die Existenz einer wirklichen Kugelhefe zu bezweifeln geneigt war.

Die **Gattung Rhizopus,** die schon von EHRENBERG im Jahre 1820 von 5 *Mucor* abgetrennt und im Jahre 1875 durch VAN TIEGHEM (2) schärfer charakterisiert worden ist, stimmt in manchen Einzelheiten mit *Mucor* überein. Es genügt also im wesentlichen die Feststellung der Unterschiede, welche zumal durch Vorhandensein eigenartiger, meist als Ausläufer oder Stolonen beschriebener Lufthyphen, sowie der aufsitzen-



Fig. 106: Sporangienträger und Sporen von *Mucor* und *Rhizopus*.
1—3: *Mucor Mucedo* BREF. mit Columella (*c*) ohne Apophyse und glatten, abgerundeten Sporen (*3*, *sp*).
4—7: *Rhizopus nigricans* EHRENBG. mit einer der Apophyse (*a*) aufsitzenden Columella (*c*), schwach eckigen, fein gestreiften Sporen (*5*, *sp*) und zweierlei Sporangienträgern: einfachen (*4*), der Anheftungsstelle (*A*) des Stolo (*st*) neben Rhizoiden entspringenden und verzweigten (*7*), direkt dem Mycel entspringenden, aus dem nicht gereizten und keine Rhizoiden entwickelnden Stolo hervorgehenden. *m* Mycel, *k* Kragenrest, *A* Appressorium.
Ungefähre Vergr. von *1* (mit verkürzt gezeichnetem Stiel): 50, von *2*: 100, von *3*: 400, von *4*: 50, von *5*: 500, von *6*: 1200, von 7: 20. — *4* nach ZOPF, *6* u. *7* nach VUILLEMIN, das Uebrige Original.

den Columella („Apophyse“ unterhalb derselben) und des faltigen Epispors gegeben sind; erstere gliedern sich gewöhnlich mehr oder minder deutlich in lange Internodien und in Sporangienträger neben Rhizoiden erzeugende Knoten. Fassen wir zunächst nur die bloßen Tatsachen ins Auge, so finden sich neben diesen büschlig an den Knoten 5 entstehenden meist kürzeren Sporenträgern (s. *Fig. 106*) aber auch solche, welche direkt dem Substrat, also nicht den Stolonen, entspringen, und die Verhältnisse liegen in der Tat komplizierter als man gewöhnlich annimmt. Rhizoiden entwickelnde Ausläufer wie verzweigte Träger sind aber ursprünglich Bildungen gleicher Art, je nachdem ob die über das 10 Substrat sich erhebende eigentümliche Hyphe durch Berührung eines festen Gegenstandes gereizt wird (s. S. 463), oder ob sie ohne dies frei in den Luftraum emporwächst, entsteht aus ihr das eine oder das andere, also entweder seitliche Sporangienträger neben Rhizoiden oder allein erstere als meist terminales Büschel (von 2—6 Trägern). Für die 15 Sache selbst ist es ja gleichgültig; ob man nun den Stolo als einen durch die Bedingungen (Berührungsreiz) in eine andere Entwicklungsrichtung gelenkten („umgewandelten“) Sporangienträger, oder den frei aufsteigenden verzweigten Sporangienträger etwa als „umgewandelten“ Stolo betrachtet. Jedenfalls hat jene Lufthyphe die besondere Eigentümlichkeit, je nach 20 den Umständen nur kurze Sporangienträger oder neben diesen gleichzeitig Rhizoiden zu entwickeln.

Vuillemin (4), der neuerdings zu diesen Fragen Stellung genommen hat, sieht den Ausläufer selbst als Sporangienstandsachse (Achse 1. Ordnung) an, die Gattung besitzt nach demselben also nur einerlei, 25 und zwar stets verzweigte Sporangienträger von übrigens sehr variabler Ausgestaltung. Normalerweise entwickelt die sich dem Substrat zuwendende Spitze der wachsenden Hyphe ihre Zweige zu Haftorganen (Rhizoiden, Hafthyphen, Haftfüßen, als Ganzes „Appressorium“ genannt), Sporangienstielen und einer neuen Sporangienstandsachse. Unter 30 abweichenden Bedingungen chemischer oder physikalischer Art (künstliche Medien, Temperatur u. a.) ändert sie jedoch ihre Richtung und es kommt bei dann ausbleibender Berührung zu alleiniger Bildung endständiger Sporangienstiele, wobei übrigens Anzahl wie Verzweigungsart schwanken; sehr auffällig ist dabei die Neigung des Achsenendes 35 zu blasiger — an *Pilobolus* erinnernder — Anschwellung (s. *Fig. 106*). Für die Deutung des Organs macht es nach dem genannten Forscher also keinen Unterschied, ob es auch Rhizoiden entwickelt oder nur sporangientragende Zweige aufweist. Untersucht wurden von demselben die Verhältnisse speziell bei *Rhizopus nigricans*, *Rh. tonkinensis*, *Rh. japonicus*, *Rh. Oryzae* (s. S. 490). Bei Erörterung dieser Fragen wird man 40 auf das Heranziehen verwandter Gattungen übrigens kaum verzichten können, für uns mögen diese Andeutungen genügen.

Das Sporangium der Gattung *Rhizopus* ist mit eingerechneter Apophyse stets fast bis ganz kuglig, ohne dieselbe halb- bis dreiviertel- 45 kuglig, dabei starr aufrecht, selten (oder niemals?) nickend, und gleich dem gesamten Träger oft durch dunkle Färbung (braun bis fast schwarz) ausgezeichnet. Seine halbkuglige, breite oder längliche Columella sitzt einem erweiterten Stielende (Apophyse) breit auf, oder, wenn man will, es setzt sich die Sporangiumwand nicht unterhalb sondern etwas 50 oberhalb der Anschwellung des Stieles an diesen an (aufsitzende Columella der Diagnosen). Die gewöhnlich undurchsichtige, oft rauhe Wand ist zur Reifezeit derb (lederig bis brüchig), nur anfangs oder

überhaupt nicht zerfließlich und springt meist ohne merklichen „Kragenrest“ ab. Die Sporen sind in reifen Sporangien späterhin — anscheinend durch gegenseitigen Druck — unregelmäßig eckig, auch derbwandiger, oft graubraun von Farbe, übrigens rücksichtlich Form und Größe von gleicher Unregelmäßigkeit wie bei *Mucor*. In älteren Sporangien verkleben sie gern zu kompakten Massen (*Rh. Oryzae*), ihre Oberfläche ist entweder glatt oder feinstachlig, die früher angegebenen leistenförmigen Verdickungen bei manchen Arten (s. A. FISCHER's Diagnose der Gattung a. a. O., S. 229) werden jedoch neuerdings als feingefaltetes Epispor gedeutet, so durch VUILLEMIN (4), dem zufolge gerade dieses — ohne sich freilich bei allen Species zu finden — für *Rhizopus* sehr charakteristisch ist. Die vielfach ausgeprägte Braunfärbung von Sporangienträgern, Ausläufern u. a. hat ihren Sitz durchweg in der Wand; der Zellinhalt ist meist farblos.

Zygosporen sind nur von einer Species (*Rh. nigricans*) genauer bekannt, von drei anderen (*Rh. nodosus, Rh. equinus, Rh. Artocarpi*) kurz erwähnt. Gegenüber denen von *Mucor* bieten sie nichts Besonderes: s. darüber bei *Rh. nigricans*.

Chlamydosporen (Gemmen) kommen vielfach und meist reichlich vor (*Rh. Oryzae, Rh. tonkinensis, Rh. japonicus, Rh. echinatus, Rh. Tritici, Rh. chinensis* u. a.), bisweilen von erheblicher Größe und Wanddicke, doch gestaltlich variabel und für Unterscheidungszwecke ohne Bedeutung.

Kugelzellen, in der älteren Literatur nicht erwähnt, entstehen bei diesen ausgesprochen luftliebenden Arten auch in sonst günstigen Nährlösungen offenbar schwierig; bei *Rh. Oryzae* kann man sie aber zufolge WEHMER (8) spärlich hervorrufen; auch für *Rh. chinensis* sind sie neuerdings von SAITO (1) angegeben worden. Kugelhefe ist bislang bei keiner Art beobachtet worden, allerdings ist daraufhin auch noch nicht besonders experimentiert worden; die Kugelzellen von *Rh. Oryzae* trieben bislang nur Keimschläuche.

Bezüglich der Abgrenzung der Gattung *Rhizopus* von weiterhin aufgestellten ähnlichen (*Tieghemella, Rhizomucor* u. a.) muß auf die Originalarbeiten verwiesen werden.

§ 103. Die Arten der Gattung Mucor.

Es ist im allgemeinen nicht schwer, von einer vermeintlich neuen Art eine Beschreibung zu geben; die Schwierigkeit beginnt erst bei der Auseinandersetzung mit den bereits vorhandenen Species bezw. dem Versuch einer richtigen Bestimmung der Art. Hier liegen nun die Verhältnisse bezüglich der *Mucor*-Arten besonders schwierig: ohne vorherige Kulturversuche ist da meist nichts Sicheres auszusagen: Größen- wie Gestaltsverhältnisse variieren schon unter denselben Bedingungen erheblich; wechseln diese aber, so scheinen ganz verschiedene Formen herauszukommen (Substrat- und Lichteinfluß).

Unter diesem Gesichtspunkt müssen schon alle älteren Species mit sehr kritischem Auge betrachtet werden, sachlich am richtigsten wäre überhaupt eine Neubearbeitung aller Arten, soweit sie erhältlich sind; mir selbst sind nur 8 genauer (in Reinkultur) bekannt. In das Chaos der alten Arten, wie man sie bei SACCARDO (1) zusammengestellt findet, hat bereits ALFRED FISCHER (1) im Jahre 1892 durch Ausschaltung einer großen Anzahl derselben Ordnung zu bringen versucht, gegen 30 mögen

davon als halbwegs existenzberechtigt bleiben, dazu sind dann in den letzten Jahren wieder gegen 40 neue Species getreten. Ob man diese ca. 70 Species wird gelten lassen, darüber müssen erst weitere Arbeiten entscheiden; zumal haben diese auch angesichts der Wandelbarkeit morphologischer Merkmale das physiologische Verhalten genau zu 5 studieren. Heute ist ein Zurechtfinden unter den Species ungemein schwierig, nicht weniger als 134 führt SACCARDO (1) auf.

Man muß sich da zunächst an den Sporangienträger halten; Höhe und Verzweigung desselben, Größe, Farbe, Oberflächenbeschaffenheit des Sporangiums, Gestalt, Größe und Farbe der Columella, etwaiger 10 Kragenrest, Gestalt, Größe, Oberflächenbeschaffenheit der Sporen liefern hier die Merkmale. Bei Arten, welche Gemmen oder Zygosporen bilden, kommen diese Organe, falls sie Unterschiede bieten, hinzu. Das fast immer farblose Mycel scheidet so gut wie ganz aus. Ueber Temperaturgrenzen und Wachstumsoptimum ist bislang nur für 15 einzelne Genaueres bekannt. Das Gleiche gilt im allgemeinen vom chemisch-physiologischen Verhalten (Enzymbildung, Säuerung usw.), den Ansprüchen an Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und anderem; fast allein dem Gärvermögen und der mit ihm vermeintlich in Zusammenhang stehenden Kugelzellbildung ist bislang mehr Aufmerk- 20 samkeit geschenkt worden. Eine ausreichende Charakterisierung liegt zurzeit erst für eine sehr beschränkte Zahl von Arten vor.

Die Merkmale des sporenbildenden Apparats sind nun leider nur mit großer Vorsicht zu bewerten; bei derselben Art kann er in fast allen Teilen starke, und nicht nur quantitative Verschiedenheiten zeigen. 25 Die Höhe des Sporangienträgers vor allem ist oft wesentlich von den Kulturbedingungen (Feuchtigkeit, Licht, Wärme, Nährboden) abhängig. Schwierigkeiten begegnet sogar die von A. FISCHER (1) versuchte Gruppierung der Species in solche mit unverzweigten, mit monopodial verzweigten und mit cymös verzweigten Trägern (Sektionen: *Monomucor*, 30 *Racemomucor*, *Cymomucor*). Sporangium, Columella, Sporen sind nach Größe, Form, Farbe u. a. bei derselben Art oft merklich verschieden. Eine sichere Unterscheidung von *Mucor*-Arten stößt also auf weit erheblichere Schwierigkeiten, als man bei oberflächlicher Betrachtung annehmen sollte. Es hat eine ganze Zahl von Merkmalen, die durch ge- 35 nauere mikroskopische Untersuchung konstatiert werden, keinen oder nur einen bescheidenen spezifischen Wert; sie variieren bei der gleichen Species und finden sich ganz ähnlich bei anderen Arten. Das gilt z. B. von der oft als wesentlich hervorgehobenen Beschaffenheit der Sporangiumwand, die je nach den Verhältnissen glatt oder mit 40 Kristallnadeln besetzt sein kann (*M. Rouxii*, *M. racemosus* u. a.), undurchsichtig oder transparent (*M. Rouxii*), zerfließlich oder brüchig ist (dies bei cymös verzweigten Arten selbst an dem gleichen Sporangienträger). Der späteren Forschung bleibt hier noch ein weites Gebiet. Sie hat in breitem Umfange auch das kulturelle Verhalten unter verschiedenen Be- 45 dingungen heranzuziehen.

Für die nicht selten recht mißliche Identifizierung einer gefundenen *Mucor*-Art ist in allen schwierigeren Fällen lebendes Vergleichsmaterial anderer Species erforderlich. Dazu wären Sammlungen aller erreichbaren Arten in mykologischen Instituten anzu- 50 legen. In kaum einer anderen Pilzgruppe erscheint eine zusammenfassende Bearbeitung an der Hand vergleichender Kulturen so angebracht wie gerade hier, wo — um mich eines alten bekannten Wortes zu be-

dienen — alles fließt, das heißt, die üblichen morphologischen Merkmale gehen und kommen, je nach den Bedingungen.

Die *Mucor*-Arten sind ganz vorwiegend Saprophyten und zumal Schimmelerreger vegetabiler Substanzen, die reich an Zucker oder 5 Stärke sind (getrocknete Früchte, Brot, Mehl, gekochte Kartoffeln). Manche bilden die regelmäßige Flora des Mistes verschiedener Tierarten (s. Bd. III, S. 418), einige lieben auch Substrate, die an Fett und Eiweiß reich sind (Milch, Käse, Fette, Häute, Erdnußkuchen und andere Futtermittel). Sie zählen mit ihren stets hell oder dunkler graubraunen 10 Vegetationen überhaupt zu den verbreitetsten Schimmelerregern. Einige kommen als Fäulniserreger an reifen Früchten (s. Bd. V, S. 43) verschiedener Art, wie Birnen, Kirschen, Tomaten, Zwetschen u. a., in Frage, so *M. piriformis* und *M. racemosus*. Pflanzenkrankheiten erregende Arten sind dagegen nicht bekannt. Wenige sind für Tiere pathogen, 15 so der frühere *M. corymbifer* (= *Lichtheimia*), auch der als *M. locusticida* bezeichnete Pilz, *M. exitiosus* und *M. pusillus*.

Die technische Bedeutung der *Mucor*- (und ebenso der *Rhizopus*-) Arten liegt vor allem in ihrem Stärkeverzuckerungsvermögen, das bei einigen (*M. Rouxii*, *M. Praini*) ausnehmend stark entwickelt ist und 20 im Gärungsgewerbe (Brennerei) praktisch ausgenützt wird (s. 13. Kap. des V. Bds.). Ebenso wirken einige Species bei anderen gewerblichen Prozessen mit: *M. hiemalis* (Hanfrotte), die zweifelhaften *M. casei* und *Chlamydomucor casei* (Reifung des Gammelost-Käses). Häufig treten einige bei der Fabrikation von Schnupftabak auf (*M. Mucedo*, *M. racemosus*), hier schwache Gärungsvorgänge erregend (s. Bd. V, S. 19). Eine derselben (*M. Mucedo*) siedelt sich auch mit Vorliebe in sauren Gerbbrühen an (s. Bd. V, S. 29); über die in der Gerberei schädigend wirkenden Arten (Stockflecken, Schleimen; s. Bd. V, S. 34) ist leider nichts Näheres bekannt. Bei anderen Prozessen (Sauerkrautfabrikation; 30 vergl. Bd. II, S. 314 u. 328), in Nahrungsmitteln (Brot, Mehl, Butter) sind Vegetationen oder Keime von *Mucor*-Arten gleichfalls verbreitet. *M. pusillus* findet man nach Miehe (1) bei der Braunheudarstellung (s. Bd. I, S. 618). *M. Mucedo* und *M. racemosus* kommen (neben *Rhizopus nigricans*) auf Hopfen vor (s. Bd. I, S. 609), ersterer nach R. Hartig (1) auch auf 35 Bucheckern in Vorratskammern, andere nicht näher bestimmte nach Lombroso (1) auf verschimmeltem Mais (s. Bd. I, S. 613). Mehrfach sind *Mucor*-Mycelien anscheinend verschiedener Species in Abwässern beobachtet; vergl. darüber Bd. III, S. 411. Wir haben also auch innerhalb der Familie der Mucoraceen eine Mehrzahl von Vertretern, die mehr 40 als ein rein wissenschaftliches Interesse beanspruchen. Bemerkenswert ist endlich eine ganze Zahl vom gärungsphysiologischen Standpunkte als Alkoholbildner. Nur die bekannteren sollen hier etwas eingehender behandelt werden, und zwar im nächsten Paragraphen die Arten der Sektion *Monomucor*, während der übernächste und der zweitfolgende Para- 45 graph den Arten aus den Sektionen *Racemomucor* bezw. *Cymomucor* gewidmet sind.

An den pathogenen Arten, wie den pathogenen Pilzen überhaupt, haben in neuerer Zeit zumal französische Forscher — und mit Recht — lebhaftes Interesse genommen. So bespricht Beauverie (1) die Mucor- 50 mykosen unter Hinweis auf die medizinische Bedeutung exakter mykologischer Studien. Barthelat (1) beschrieb die pathogenen Mucorineen sowie experimentelle und spontane Mucormykosen. Neben Ascomyceten und Fungis imperfectis findet man jene auch in dem Werke von Gedoelst (1)

behandelt, ebenso bei PINOY (1) und in dem zumal für Botaniker in Betracht kommenden von GUÉGUEN (1) über parasitische Pilze des Menschen und der Tiere, während BODIN (1) lediglich die ersteren bearbeitete. Das sind nicht weniger als sechs zusammenfassende Darstellungen bezw. Werke im Verlauf von vier Jahren, denen in Deutschland nicht eins gegenüberzustellen ist. Dazu kommen noch die Arbeiten französischer Forscher (COSTANTIN und LUCET, VUILLEMIN, BAINIER u. a.) über einzelne Species. Nicht weniger sind Holländer und Franzosen bekanntlich Führer gewesen im Studium technischer Mucoraceen (der sogen. *Amylomyces*-Arten), die neben ebensolchen Aspergillaceen gleichfalls in dem Werke eines französischen Forschers, NEUVILLE (1), zusammenfassend bearbeitet sind.

Mit dem Gärvermögen und der Enzymbildung vieler Species haben wir uns im folgenden Kapitel noch zu beschäftigen, sonstige physiologische Eigentümlichkeiten sind bei der Besprechung der verschiedenen Arten beiläufig erwähnt. Bemerkenswert erscheint, daß nur ca. 4—5 Arten ein höherliegendes Wachstumsoptimum besitzen (*M. Rouxii*, *M. javanicus*, *M. pusillus*), die Mehrzahl entwickelt sich, bei einem wenige Grad über Null liegenden Minimum, am besten bei mittlerer Temperatur (*M. Mucedo*, *M. piriformis*, *M. racemosus*, *M. hiemalis* u. a.). Die Keimfähigkeitsdauer trockenen Materials schwankt sehr, *M. locusticida* hat (ähnlich wie *Phycomyces nitens*) nach LINDAU (1) eine Lebensdauer von kaum einem halben Jahr, über zwei Jahre hält sie sich jedenfalls bei *M. javanicus* und *M. Rouxii*, dazwischen liegen *M. piriformis*, *M. hiemalis* (auch *M. rhizopodiformis* = *Rhizopus Cohnii*, sowie *Rhizopus Oryzae*), von denen nur Mycelteile, wahrscheinlich die Gemmen, aber nicht Sporen, über zwei Jahre eingetrocknet liegen können, doch mit Ausnahme des sehr bald ganz absterbenden *M. hiemalis*; vergl. WEHMER (6). Die nachteilige Wirkung von Radiumstrahlen auf einige Arten untersuchte DAUPHIN (1), den der eigenen Stoffwechselprodukte NIKITINSKY (1). Höhere Temperaturen als ca. 60—70 ° C ertragen, wie es scheint, die Mucoraceen nicht gut; vergl. O'BRIEN (1). Auf die weitere umfangreiche physiologische Literatur, die sich in zahlreichen Arbeiten zumal mit *M. Mucedo*, *M. racemosus* (neben *Rhizopus nigricans*) beschäftigt, kann hier aber nur hingewiesen werden.

Die sämtlichen *Mucor*-Arten aufzuzählen, ist nicht Zweck dieses Werkes, es sei da kurz auf SACCARDO (1), auch auf die gesichtete Zusammenstellung bei A. FISCHER (1) verwiesen. Freilich ist seit 1892 noch eine erhebliche Zahl von Species hinzugekommen, die hier zweckmäßig wenigstens dem Namen nach genannt werden:

So beschrieb BAINIER (1) im Jahre 1903 allein 10 Species: *M. comatus*, *M. reticulatus*, *M. vicinus*, *M. neglectus* (dieser Speciesname ist schon im Jahre 1887 von VUILLEMIN für eine andere Art vergeben worden!), *M. flavus*, *M. limpidus*, *M. communis*, *M. fuscus*, *M. vulgaris* (dieser Name ist gleichfalls schon von MICHELI im Jahre 1729 gebraucht worden!).

SCHOSTAKOWITSCH (1—5) stellte in den Jahren 1896—1898 folgende sieben Species auf: *M. Wosnessenskii*, *M. angarensis*, *M. irkutensis*, *M. heterosporus sibiricus*, *M. de Baryanus*, *M. proliferus*, *M. agglomeratus*.

SPEGAZZINI (1) beschrieb in den Jahren 1891 und 1899 vier neue: *M. platensis*, *M. caespitulosus*, *M. olivacellus*, *M. funebris*.

OUDEMANS (1) stellte in den Jahren 1900—1902 deren sechs auf: *M. subtilissimus*, *M. adventitius*, *M. hygrophilus*, *M. speciosus*, *M. geophilus*, *M. Saccardoi* (= *Proabsidia Saccardoi* VUILLEMIN); sie sind, gleich den

Species BAINIER's, für welche Größenangaben nur zum Teil vorliegen, mangels kultureller und physiologischer Merkmale durchweg kaum ausreichend beschrieben. Kritisch sind auch einige der Species von SCHOSTAKOWITSCH.

Dazu kommen dann noch von verschiedenen Autoren: *M. alpinus* und *M. neglectus* E. CHR. HANSEN (2) (bislang ohne Diagnosen, über *M. neglectus* s. auch S. 469), *Mucor* (= *Zygorhynchus*) *Moelleri* VUILLEMIN (6), *M. hiemalis*, *M. javanicus* und *M. Rouxii* WEHMER (letztere Art ist der *Amylomyces Rouxii* (CALMETTE), *M. dubius* a. i. WEHMER, *M. racemosus var. brunnea* MORINI (1), *M. rubescens* LÉGER (1), *M. Praini* (CHODAT et NECHITCH, *M. Cambodja* CHRZASZCZ (ist ein *Rhizopus*), *Mucor casei* JOHAN-OLSEN (ohne Diagnose), *Mucor β* und *M. γ* (oder *Amylomyces β* und *γ*) BOIDIN (sind gleichfalls *Rhizopus*-Arten), *M. locusticida* LINDAU (ist anscheinend kein *Mucor*, s. S. 489), *M. exitiosus* MASSEE (1), *M. Ramannianus* ALFR. MOELLER (1). Nur mit Zahlen sind von einigen Forschern, so BLAKESLEE (1), auch WINKLER (1), Arten bezeichnet worden, deren Bestimmung unterblieb. Die Diagnosen der genannten Arten findet man in dem verdienstvollen Werk SACCARDO's (1) im 16. und 17. Bande zusammengestellt, auf die meisten ist auch weiterhin noch einzugehen.

Man braucht diese ca. 40 Arten nun keineswegs alle gelten zu lassen, und sicher würden viele der Namen wieder verschwinden, wenn überhaupt eine genaue Durcharbeitung möglich wäre; die Sache sieht also für den neu an sie Herantretenden gefährlicher aus, als sie ist. Bedauerlich bleibt trotzdem die Belastung auch der neuesten Literatur mit so vielen Namen, für die bisweilen weder eine ausreichende Beschreibung noch eine Abbildung gegeben ist. Es genügt doch schließlich nicht, wenn der Autor selbst von der Neuheit seiner Species überzeugt ist. Vielfach ist bei den Autoren nicht einmal von einem Vergleich mit anderen schon bekannten Species die Rede; es wird nur ein neuer Name gemacht. Im Interesse der Sache ist das um so bedauerlicher, als in dieser Gattung, wie schon bemerkt, die Artunterscheidung überhaupt recht schwierig ist. Es sollte hier streng der Grundsatz gelten, jede neue Species sowohl gestaltlich wie physiologisch genau zu beschreiben und nur solche wären als neu anzuerkennen, die unzweideutig durch ganz bestimmte Merkmale von den bereits vorhandenen ähnlichen abweichen, so daß sie auch von jedem mit der Materie Bekannten unterschieden werden können. Eine Schwierigkeit liegt natürlich in der oft mangelhaften Beschreibung älterer Arten, soweit solche unkenntlich, wären sie zu ignorieren; das Ideale wäre überhaupt eine gründliche Neubearbeitung der ganzen Gattung lediglich auf Grund kultureller Versuche hin, praktisch ist das natürlich kaum erreichbar.

Unser Interesse beschränkt sich auf folgende Species, die nach der Art ihres Sporangienträgers in drei Abteilungen aufgezählt sein mögen: 1. *Mono-Mucor: M. Mucedo*, *M. piriformis*, *M. hiemalis*. — 2. *Racemo-Mucor: M. racemosus* (*M. erectus*, *M. fragilis*, *M. pusillus*), *M. corymbifer* (= *Lichtheimia corymbifera*). — 3. *Cymo-Mucor*: *M. Rouxii*, *M. javanicus*, *M. Praini* (*M. alternans*, *M. circinelloides*, *M. ambiguus*, *M. plumbeus* = *M. spinosus*).

Sonstige Arten sind nur beiläufig, auch die in Klammer gesetzten nur kurz besprochen. Daß die Einteilung in diese drei Gruppen mehr ein Notbehelf und nicht streng durchzuführen ist, wurde bereits angedeutet, tatsächlich können einige Species alle drei Verzweigungsarten aufweisen.

Beiläufig mag hier die interessante Tatsache erwähnt werden, daß

Infektion einer Kultur durch Fremdorganismen (Bakterien) von einer erheblichen Aenderung der gesamten Merkmale (Sporangiengröße, Form der Columella, Sporenfarbe), darunter auch der Verzweigungsart, gefolgt sein kann, vergl. SCHOSTAKOWITSCH (3 u. 5). Es schließt das also direkt an die Mißbildungen aus anderen Ursachen (ungünstiges Substrat, 5 Wachstumstemperatur oberhalb des Optimums u. a.) an und deutet wiederum auf die den Sporenträgern dieser Pilze innewohnende mangelnde Formbeständigkeit und leichte Wandelbarkeit. Aehnliche Wirkungen hat auch der Einfluß parasitischer Pilze, teils aus der nahe verwandten Familie der Cephalideen, teils aus der Gruppe der Hyphomyceten stam- 10 mend, über die man als häufige Begleiter von *Mucor*-Arten bei A. FISCHER (1) eine kurze Uebersicht findet. Unreine Kulturen werden durch sie im Aussehen völlig verändert. Zur leichteren Orientierung folge noch eine

Arten-Uebersicht.

I. Nach dem Wachstumsoptimum:
  1. Optimum unterhalb 30° C liegend (ca. 20—25°): *Mucor Mucedo, M. piriformis, M. racemosus, M. Praini, M. hiemalis.*
  2. Optimum oberhalb 30° C liegend (30—40°): *M. corymbifer* (= *Lichtheimia corymbifera*, gegen 40°), *M. pusillus* (40°), *M. javanicus* (ca. 37°), *M. circinelloides* (ca. 35°?), *M. Rouxii* (ca. 35°?; hierher auch sämtliche *Rhizopus*-Arten, soweit genauer bekannt).

II. Nach Gestalt und Größe der Sporen:
  1. Gruppe; Species mit streng kugligen Sporen: *M. heterogamus* (= *Zygorhynchus heterogamus*, 2—3 μ im Durchm.), *M. pusillus* (3—3,5 μ), *M. globosus* (4—8 μ), *M. plumbeus* (= *M. spinosus*, im Mittel 6 μ), *M. corymbosus* (7 μ).
  2. Gruppe; Species mit vorwiegend länglichen Sporen:
     a) Sporen meist nicht über 3 μ dick (2—3 μ): *M. Rouxii, M. hiemalis, M. fragilis, M. alternans, M. circinelloides, M. corymbifer.*
     b) Sporen meist über 3 μ dick (3,5—7 μ): *M. Mucedo, M. piriformis, M. racemosus, M. javanicus, M. erectus, M. Praini, M. ambiguus.* In wie weit eine scharfe Trennung der beiden Untergruppen a und b praktisch durchführbar ist, bleibt weiterhin festzustellen.

§ 104. Mucor-Arten mit meist unverzweigtem Sporangienträger (Sectio Monomucor). 15

Die Arten mit meist unverzweigtem Sporangienträger sind in der Minderzahl, zu ihnen rechnen aber die bestgekannten, so *Mucor Mucedo* BREF. und *M. piriformis* A. FISCHER. Von den übrigen, wie *M. mucilagineus* BREF., *M. plasmaticus* v. TIEGH., *M. rufescens* A. FISCHER, *M. irkutensis* SCHOSTAK., *M. proliferus* SCHOSTAK., *M. Wosnessenskii* SCHOSTAK., 20 *M. hiemalis* WEHMER u. a., kommt hier für uns nur noch die letztgenannte in Betracht. Vorweg sei hervorgehoben, daß mindestens vier bis fünf dieser Species neben unverzweigten auch monopodial oder cymös verzweigte Sporenträger entwickeln, wie andrerseits der auf S. 475 genannte *M. racemosus* z. B. nicht selten vorwiegend einfache 25 Träger ausbildet.

Mucor Mucedo (LINNÉ) BREFELD ist ein oft untersuchter häufiger Pilz, allbekannt durch sein regelmäßiges Vorkommen auf Mist, zumal von Pferden, aus dem er jederzeit (s. Bd. III, S. 418) nach Ueberdecken mit Glasglocke in hohen dichten Schimmelrasen von grauweißer Farbe 30 hervorgelockt werden kann; auch auf anderen animalischen oder vegetabilischen Substraten verbreitet. Als Versuchspilz für pflanzenphysiolo-

gische Experimente spielt er fast die gleiche Rolle wie *Aspergillus niger* unter den Aspergillaceen, dagegen kommt er technisch nur selten in Frage; jedenfalls ist er nicht, wie das früher von DAVAINE angegeben wurde, an der Obstfäule beteiligt (vergl. Bd. V, S. 39), dürfte aber gelegentlich in Haushalt wie Gewerbe (Molkerei, Gerberei) — wohl meist störend — mitspielen, da er Eiweiß wie Fett leicht spaltet und auf Butter wie Käse gut wächst (s. 22. Kap.). Bemerkenswert ist sein gelegentliches Auftreten auf Hopfen und Bucheckervorräten; vergl. Bd. I, S. 609 u. 612. Nachgewiesen ist er auch in sauren Gerbereibrühen sowie bei der Schnupftabakfabrikation. Naheliegend ist seine Beteiligung bei der Lederzersetzung (s. Bd. V, S. 34). HAUMAN (1) führt ihn — unter Widerspruch von J. BEHRENS — auch unter den Rotteerregern des Flachses auf. Nach dem ersten Versuch der Bearbeitung seiner Entwicklungsgeschichte durch A. DE BARY (2), welcher, ähnlich wie VAN TIEGHEM (6) später, irrtümlich *Thamnidium*, *Chaetocladium* und andere Pilze in seinen Formenkreis zog, gab erst BREFELD (1) im Jahre 1872 eine richtige Darstellung seiner Morphologie. Größe wie Gestalt der Sporangienträger sind im Gegensatz zu den meisten Diagnosen recht schwankend, zwar werden die Rasen unter den üblichen Laboratoriumsbedingungeu nicht selten 10 cm und darüber hoch, unter natürlichen Verhältnissen (an freier Luft wachsend) aber kaum 3 bis 4 cm. Zwecks Herstellung dieser ist also sowohl feuchtigkeitsgesättigte Atmosphäre wie einseitiger Lichteinfall auszuschließen; das gilt übrigens für alle Mucorineen und muß bei Aufstellung der Diagnosen wohl beachtet werden. Ueberdies entstehen in notorischen Reinkulturen nicht bloß einfache, sondern auch reichlich sehr kleine verzweigte Träger mit ca. 3—6 ungleich großen Sporangien, die in ihren Details mit den großen übereinstimmen, so daß man von einem wirklichen Dimorphismus sprechen kann. Derartiges ist auch schon früher von BREFELD sowie VUILLEMIN konstatiert worden, es hat nicht notwendig seinen Grund in fremdartigen Einflüssen (Infektion). Das Sporangium (s. *Fig. 107*) ist kuglig, orange-

Fig. 107. *Monomucor*-Arten.
1—3: *Mucor Mucedo* (L.) BREF., *4—6*: *M. piriformis* A. FISCHER, *7—11*: *M. hiemalis* WEHM. Die Sporangienträger (*1*, *4*, *7*) überall in nat. Größe mit schwach vergrößertem Sporangium. Columella und Sporen der drei Species sind von verschiedener Gestalt. *c* die Columella, *k* der Kragenrest, *3*, *6*, *9* die Sporen. — Chlamydosporen (*10*) und Kugelzellen (*11*) von *M. hiemalis*. — Annähernde Vergr. von *2*: 100, von *3*: 630, von *5*: 70, von *6*: 700, von *8*: 200, von *9*: 800, von *10*: 100, von *11*: 170. *5—11* nach WEHMER, das Uebrige Original.

farben oder graubraun, nicht braunschwarz, wie man gelegentlich angegeben findet, von mittlerer Größe (meist 100—200 μ im Durchmesser), dicht mit feinen Nädelchen besetzt. Nur bei soeben gereiften jüngeren Sporangien zerfließt die Wand bei Berührung, bei älteren findet das nur noch im Wassertropfen unter Deckglas — doch auch nicht immer — statt. Als Rest bleibt innerhalb der sich rasch ausbreitenden Sporenmasse eine hohe bis ca. 120 μ lange farblose, nicht aufsitzende Columella mit kleinem Kragenrest stehen. Die glatten Sporen sind gestaltlich sehr gleichartig, durchweg langgestreckt (ca. 1 : 2), doch in der Größe ungemein variabel, durchschnittlich groß, 12—18 μ lang und 6—7 μ dick, ausnahmsweise auch 24 μ lang (nach eignen Messungen), aber auch merklich kleiner, so in den zarten Sporangien der zwergigen, wenige Millimeter hohen Träger. Die von A. Fischer angegebene Durchschnittsgröße von 6—12 μ zu 3—6 μ dürfte wohl etwas niedrig angesetzt sein, ähnlich die J. Schroeter's (1) von 7—12 μ zu 4—6 μ. Wie die meisten *Mucor*-Species ist diese Art nach Blakeslee (1), der die Zygosporenbildung hier genauer verfolgte, heterothallisch, die schwarzen warzig-stachligen Zygosporen sind in der Größe sehr wechselnd, haben meist 90—250 μ im Durchmesser, können aber bis 1 mm erreichen. Ein negatives Merkmal gegenüber ähnlichen Arten ist das Fehlen von Gemmen (Chlamydosporen), Kugelzellen und Kugelhefe. Selbst bei Vegetation unter Luftabschluß kommt es also zu keinem merklichen Zerfall der Hyphen und keinen Sprossungserscheinungen; frühere derartige Angaben, so z. B. von Reess (1), sind jedenfalls nicht auf *M. Mucedo* zu beziehen. In Zuckerlösung (Würze) wird zwar etwas Alkohol gebildet, Gärungserscheinungen treten jedoch kaum oder gar nicht auf, die Entwicklung des Pilzes ist an ungestörten Luftzutritt gebunden; bei Ueberschichten von Agarkulturen im Reagensglas mit gärfähiger Zuckerlösung steht die Entwicklung still, man beobachtet nur spärliches Gasaufsteigen. Gemmen wurden allerdings von J. Schroeter (2) angegeben. Ueber die Empfindlichkeit der Art gegen Metallgifte liegen neuere Versuche von C. Pulst (1) vor, über chemische Wirkungen vergleiche man das folgende Kapitel. Speziell über seine Enzymwirkungen handelt auch Schäffer (1), über chemische Reizbarkeit Miyoshi (1). Von einer Aufzählung der großen Zahl physiologischer Arbeiten über diesen vielgebrauchten Versuchspilz muß hier aber abgesehen werden, sie sind an anderen Stellen des Buches erwähnt. Diese Art ist leicht auf den üblichen Substraten (Brot, Reis, Würze, Zuckerlösung mit und ohne Gelatine bezw. Agar) kultivierbar; sie verflüssigt Gelatine nur mäßig. Genauere morphologische Details findet man bei Brefeld (1), A. Fischer (1), Blakeslee (1), Abbildungen besonders bei Brefeld, auch in den meisten botanischen Lehrbüchern.

Mucor piriformis A. Fischer ist als Bewohner faulen Obstes (Birnen, Aepfel, zumal oft die Fäulnis von Birnen hervorrufend) zuerst von A. Fischer (1) aufgefunden und nach der vorwiegend birnähnlichen Gestalt der Columella (s. *Fig. 107*) benannt worden. Die gewöhnlich nur in feuchtem, abgeschlossenem Raum (große feuchte Kammer, unter Glasglocke), reichlich aus den Faulstellen emporwachsenden, stets unverzweigten Sporangienträger variieren hinsichtlich der Größe stark (einige Millimeter bis ca. 8 cm), messen aber im Mittel (so auch in Kulturen) ca. 1—3 cm und sind gewöhnlich mit feinen Wassertröpfchen dicht bedeckt; ihr weißglänzender, meist nicht starr aufrechter, sondern etwas hin und her gebogener, 30—80 μ dicker Stiel fällt leicht um. Die

kugligen, sehr ansehnlichen und die fast aller anderen Arten an Größe übertreffenden, bis 400 μ im Durchmesser haltenden Sporangien sind im Alter braunschwarz, mit rasch zerfließender Wand, die bald glatt, bald feinstachlig sein kann, gewöhnlich auch keinen Kragenrest hinter-
5 läßt. Gestalt und Dimensionen der Columella sind gleichfalls schwankend; neben birnartigen kommen ovale bis fast kuglige Formen vor, ihre Dimensionen bewegen sich zwischen 80 μ zu 65 μ und 300 μ zu 280 μ. Die Sporen sind vorherrschend ellipsoidisch, ziemlich gleichgroß (7 μ zu 4,2 μ), in den Extremen zwischen 5—13 μ zu 4—8 μ schwan-
10 kend. Zygosporen sind bislang unbekannt, doch bildet die auch Gärungserscheinungen erregende Art Kugelzellen sowie derbwandige Gemmen. Geradezu kennzeichnend ist die Bildung eines intensiven fein esterartigen Geruches auch in Kultur, den man in dieser ausgesprochenen Weise bei keiner der anderen bislang darauf geprüften
15 Arten (*M. Rouxii*, *M. javanicus*, *M. hiemalis* u. a.) findet. Die Kulturen sind also schon durch den Geruch zu erkennen; vergl. WEHMER (5 u. 9). Zuckerlösungen säuert diese Art an (Bildung freier Citronensäure, s. 22. Kap.). Weitere Angaben bei FISCHER (1) und WEHMER (5), ebenda Abbildung.

20 *Mucor hiemalis* WEHMER ist von J. BEHRENS (1) als bei der Winterlandrotte des Hanfes mitwirkend aufgefunden und von WEHMER (4) näher beschrieben worden. Er findet sich auf den Hanfstengeln und löst bei der Rotte die Mittellamellensubstanz des grünen Rindengewebes. Die schneeigen Sporangienrasen sind weit zarter, auch niedriger als die der
25 vorigen Art. Der mit einem für das bloße Auge kaum wahrnehmbaren, zierlichen, grauen bis bräunlichen Sporangium (52 μ im Durchmesser) abschließende Träger ist ca. 1—2 cm hoch. Das Sporangium ist auch hier streng kuglig mit glatter, zunächst zerfließlicher Wand, von der keine oder unregelmäßig lappige Kragenreste zurückbleiben. Die Colu-
30 mella ist kuglig oder oval, auch in ihren Dimensionen schwankend (28—48 μ Durchmesser, bezw. 25 μ zu 21 μ bis 36 μ zu 29 μ). Gleiches gilt von den Sporen, deren Durchnittsgestalt langgestreckt ellipsoidisch bis bohnenförmig ist; Durchschnittsgröße 7 μ zu 3,2 μ (Grenzen 3—8,4 μ zu 2—5,6 μ). Zygosporen sind bislang unbekannt, dagegen findet man in
35 Kulturen neben Kugelzellen reichlich Gemmen, die oft zu beträchtlicher Größe und Wanddicke heranwachsen, in der Regel auch dicht mit großen gelben oder farblosen Oeltropfen gefüllt sind. Das Mycel ruft alkoholische Gärung hervor, säuert auch Zuckerlösung an, verhält sich also wie das der vorigen Art. Die Species besitzt sehr niedrige Wachs-
40 tumstemperatur; das Minimum liegt wenige Grade über Null, das Optimum unterhalb 30° C.

Von weiteren vielleicht in diese Gruppe gehörigen Arten wäre noch ein Pilz zu nennen, der bei dem Reifungsprozeß einer norwegischen Käseart (Gammelost, s. Bd. II, S. 185 u. 305) mitwirkt, von seinem
45 Autor aber nicht näher beschrieben ist. Da Mucoraceen auch sonst in der Käsemasse vorkommen können, so steht es dahin, ob diese von JOHAN-OLSEN (1) als *M. casei* bezw. *Chlamydomucor casei* bezeichnete Art überhaupt etwas Neues ist, um so mehr als ein gleichfalls gefundenes *Penicillium* vom Autor kurzerhand als *P. aromaticum nova species* —
50 ohne Beschreibung oder Vergleich mit schon bekannten aufgeführt wird.

§ 105. Mucor-Arten mit traubig verzweigtem Sporangienträger (Sectio Racemomucor).

Die Angehörigen dieser Gruppe sind nur vereinzelt für uns von Interesse. Von den hierher zählenden Arten der Literatur, nämlich *M. racemosus* FRES., *M. erectus* BAIN., *M. fragilis* BAIN., *M. corymbifer* COHN, *M. de Baryanus* SCHOSTAK., *M. tenuis* BAIN. (bildet auch unverzweigte Träger!), *M. mollis* BAIN., *M. heterogamus* VUILLEM. (= *Zygorhynchus*, s. S. 480), *M. heterosporus* A. FISCHER, *M. corymbosus* HARZ, *M. pusillus* LINDT, *M. citiosus* MASSEE, *M. proliferus* SCHOSTAK. (auch unverzweigte Sporangienträger!) u. a., kommen hauptsächlich nur zwei hier in Frage, von denen zwar viel aber nicht immer Sicheres bekannt ist. Die meistgenannte *Mucor*-Art überhaupt ist

Mucor racemosus FRESENIUS (1). Die Species ist als Beispiel eines alkoholische Gärung erregenden Fadenpilzes altbekannt. Im übrigen ist es zweifelhaft, ob die älteren Forscher wirklich diesen Pilz rein vor sich hatten und nicht vielmehr den Namen für eine Mehrzahl nicht genauer definierter Arten gebrauchten; man vergleiche darüber das folgende Kapitel (unter Kugelhefe), wie auch die betreffende Erörterung bei A. FISCHER (1). Selbst neuere Beobachter stimmen in ihren Beschreibungen untereinander nicht ganz überein. Als hervorstechendes Merkmal sei hier die Leichtigkeit, mit der in reichlichem Maße Gemmenbildung (Chlamydosporen) eintritt, genannt; auch sind die kleinen Sporangien auf zarten grauweißen Stielen mit bloßem Auge kaum sichtbar (ca. 50 μ im Durchmesser). In der Literatur ist der Pilz oft behandelt, so von REESS (1), PASTEUR (1), BREFELD (2 u. 8), MORINI (1), BAINIER (3), VAN TIEGHEM (4), KLEBS (1), E. CHR. HANSEN (2), WEHMER (7) u. a.; eine genauere Diagnose hat erst A. FISCHER (1) im Jahre 1892 entworfen. Eingehend untersucht wurde er zuerst von BREFELD (8) als *Chlamydomucor racemosus*, welcher Name allerdings sein hervorragendes Vermögen zur Chlamydosporenbildung kennzeichnet, aber durch die späteren Beobachtungen, daß auch andere Arten diese Organe erzeugen, hinfällig geworden ist. Dieser Pilz findet sich auch zufolge SAITO (5) unter den Luftkeimen in Japan, soll aber in Sibirien bei Irkutsk zufolge SCHOSTAKOWITSCH (2) sehr selten sein. Ein allgemeines Interesse hat er durch sein oft in der Literatur behandeltes Gärvermögen erlangt (s. 22. Kap.), das man früher seiner „Kugelhefe“ (s. diese) zuschrieb.

Die feinen, je nach den Kulturbedingungen 0,5—3 cm hohen, weißen bis grauen oder hellbräunlichen Rasen (s. *Fig. 108*) findet man auf allerlei vegetabilischem Substrat (Brot, Pflanzenteilen, Hutschwämmen, süßen Früchten usw.), auch auf Pferdedünger, toten Insekten, Milch, Käse u. a. In Kultur wächst der Pilz gut auf den üblichen Substraten (Würze, Zuckerlösung mit Mineralsalzen, sowohl ohne wie mit Gelatine oder Agar). Erschwert wird seine Identifizierung durch die in betreff der Verzweigung leider sehr variablen Sporangienträger; oft überwiegen unverzweigte Träger, selbst die besondere Verzweigungsart (racemisch, auch cymös) ist nicht immer scharf ausgeprägt. Die Sporangien sind sehr klein, bis ca. 50 μ im Durchmesser (nach A. FISCHER 20—70 μ), gelblich oder bräunlichgelb, mit durchsichtiger Wand, die wohl gewöhnlich nicht feinstachlig ist, worüber man A. FISCHER (1), J. SCHROETER (2), WEHMER (7) und dagegen BREFELD (8) vergleiche, und sowohl zerfließlich (WEHMER) wie fest und brüchig (FISCHER) sein kann. Der variable Charakter der Sporangienwand ist hier also klar, auch fand KLEBS (1)

direkt bei auf Brot gezogenem Pilz nur winzige Kalkkörnchen und schnelles Zerfließen, bei dem auf Peptonlösung gewachsenen dagegen reichliche Bedeckung mit Oxalatkristallen und spröden, zerbrechlichen Charakter der Wand. Die Merkmale dieser Art stehen also unter dem



Fig. 108. Mucor racemosus Fresenius.
1: Sporangienträger, *2*: Sporangium, *3*: Columella, *4*: Kugelzellen (Oidien), *5*: Gemmen (Chlamydosporen), *6—7*: sprossende Kugelzellen (Kugelhefe), *k* Knospen, *8*: mit Keimschlauch (*ks*) auswachsende Sporen, *9*: junge Hyphe, in Zerfall und knospend (*k*). — Ungef. Vergr. von *1*: 2, von *2* u. *3*: 300, von *4*: 120, von *5*: 80, von *6—9*: 300. *2—5* nach Brefeld, *6* u. *7* nach Pasteur, *8* u. *9* nach Reess.

Einfluß der Kulturbedingungen. Die Columella ist oval bis verkehrt eiförmig, mit schwachem Kragenrest, farblos, glatt, von im übrigen sehr schwankenden Dimensionen, im Mittel 22 μ hoch und 17 μ dick (Wehmer), doch auch bis über das Doppelte (Fischer). Die Sporen sind glatt, farblos, ellipsoidisch, im Mittel nach Wehmer ca. 6 μ lang und 4.2 μ dick, was mit J. Schroeter's (1) Angaben (5—8 μ zu 4—5 μ) gut übereinstimmt, aber auch größer oder wesentlich kleiner, nach A. Fischer (auch Schroeter) selbst kuglig (?) und merklich größer (6—10 μ lang, bei 5 bis 8 μ Dicke). Ein sehr genaues Bild läßt sich hiernach kaum geben. Die Art bildet wenig regelmäßig, und wohl meist spärlich, bräunliche kuglige Zygosporen mit warzigem Exospor, von ca. 70—80 μ Durchmesser, (also relativ klein!); vergl. darüber Bainier (7), wo solche genauer beschrieben sind, wie auch Morini, Léger (1), Brefeld und Klebs (1), welche beiden letzteren Forscher Zygosporen überhaupt nicht erhalten konnten. Auch Azygosporen kommen vor.

Die Gemmen (Chlamydosporen) sind wie bei den anderen Arten

in Form und Größe so variabel, daß Unterschiede daraus nicht entnommen werden können (ca. 10—30 μ lang, meist ellipsoidisch, farblos, glatt, mit mäßig derber Wand und hellem Inhalt). Ihr Entstehungsort ist ganz beliebig (in Mycel wie Sporangienträgern); man vergleiche darüber auch BREFELD, VAN TIEGHEM, BAINIER, KLEBS u. a. Eine Aufteilung des submersen Mycels in Kugelzellen findet unter gewöhnlichen Bedingungen nur wenig ergiebig statt, reichlicher — wie schon auf S. 462 angegeben — bei experimentell herbeigeführtem Luftmangel in zuckerhaltigen Flüssigkeiten; man vergleiche darüber neuerdings WEHMER (7), sowie das 22. Kapitel. Dieser Zerfall geht aber keineswegs mit der von älteren Forschern (BAIL u. a.) angegebenen Leichtigkeit von statten; ebenso sprossen dieselben selbst bei Sauerstoffabschluß nur ziemlich spärlich (Kugelhefe).

In Zuckerlösungen ruft diese Art alkoholische Gärung in mäßiger Intensität hervor (s. 22. Kap.), für die nach früheren Angaben (PASTEUR u. a.) Sauerstoffmangel anstoßgebend sein sollte, speziell wurden die Sprossungsvorgänge der Kugelhefe mit der Alkoholbildung kausal verknüpft. Diese steht jedoch, wie neuerdings (1905) genauer festgestellt worden ist, weder mit der Kugelhefe noch mit dem Luftabschluß in Zusammenhang, sondern das unveränderte Mycel spaltet, wie WEHMER (7) zeigte, auch bei vollem Sauerstoffzutritt reichlich Alkohol ab. Gerade bei diesem vielgenannten Pilz ist also keineswegs die „Mucorhefe“ das gärungserregende Agens.

Bei Brutwärme kommt *M. racemosus* nicht mehr zur Entwicklung; er versagt gewöhnlich schon bei ca. 32° C. Auch die Gärungserscheinungen verlaufen am besten bei mittlerer Temperatur; nach Feststellungen von KLEBS (1) liegt das Wachstumsoptimum bei ca. 20 bis 25°, das Minimum bei 4°, das Maximum bei ungefähr 33°. Als Minimum gibt E. CHR. HANSEN (2), der sich eingehender mit den Temperaturen für Mycelentwicklung, Zygosporen-, Sporangien-, Gemmen- und Kugelzell-Bildung beschäftigte, sogar 0,5° an. Nennenswerte Säuerung fehlt, die Gelatineverflüssigung ist langsam, erst nach längerer Zeit eintretend, übrigens bislang bezüglich der Umstände kaum näher verfolgt. Das kulturelle Verhalten bedarf in einzelnen Punkten überhaupt noch besserer Durcharbeitung. Bemerkenswert ist die schon von FITZ beobachtete Invertin-Bildung bei dieser Art (Vergärung von Rohrzucker!). Die Einwirkung auf Eiweiß studierte BUTKEWITSCH (1). Ueber die Alkoholgrenze gehen die Angaben stark auseinander (ca. 2,5—7 Proz.); vergl. darüber das 22. Kapitel.

Die praktische Bedeutung der Art ist zurzeit noch gering; gelegentlich tritt sie als Fäulnispilz reifer Früchte auf, ist da aber an den zierlichen Sporangien von dem praktisch weit wichtigeren *M. piriformis* (s. S. 473) leicht zu unterscheiden. KOLKWITZ glaubt sie neben anderen auch in Abwässern gefunden zu haben (s. Bd. III, S. 412); Näheres über die in Abwässern vorkommenden *Mucor*-Arten ist leider noch nicht bekannt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß sie mehrfach noch im Gewerbe (u. a. in der Käserei) vorkommt; Tatsache ist zufolge BEHRENS (3) ihr Mitspielen in der Schnupftabakfabrikation (s. Bd. V, S. 19). Ueber enzymatische Wirkungen des *M. racemosus* (ob die gleiche Art?) arbeitete auch SCHÄFFER (1). Spezieller mit diesem Pilz nach verschiedenen Seiten hin beschäftigte sich KLEBS (1). Es kann hier aber nicht auf die große Zahl zumal früherer physiologischer Arbeiten, die an anderen

Stellen (insbesondere des Ersten Bandes) dieses Werkes erwähnt sind, besonders hingewiesen werden. Nach BOLLINGER (1) sollte *M. racemosus* gelegentlich in den Atmungsorganen lebender Vögel vorkommen und selbst schwere Erkrankung und Tod herbeiführen. Ob es sich da wirk-
5 lich um diese Art handelt, erscheint schon angesichts des niederen Temperaturmaximums von ca. 33° C für das Wachstum recht fraglich, wie denn auch nach BARTHELAT (1) weder *M. racemosus* noch *M. Mucedo*, *M. alternans* und selbst *Rhizopus nigricans*, im Gegensatz zu
10 *M. corymbifer (Lichtheimia corymbifera)*, Mykosen hervorriefen.

Im Hinblick auf die durch die abweichenden Beschreibungen entstehende Unsicherheit wäre ein näherer Vergleich
15 der von den verschiedenen Autoren als *M. racemosus* behandelten Pilze sehr angebracht und nach Möglichkeit anzustreben. Die Abbildung des Sporangienträgers (s. *Fig. 109*) bei KLEBS (1) und ebenso eignes Ma-
20 terial weicht von dem Bilde BREFELD's (s. Fig. 43 in Bd. I, S. 187) schon erheblich ab; verständlich wird der Unterschied freilich durch die Angabe bei KLEBS, daß auch cymöse Verzweigung der Sporangien-
25 träger vorkommen kann, worüber anscheinend nur die Wachstumsbedingungen entscheiden. Mißbildungen treten zumal unter ungünstigen äußeren Bedingungen auf; Auswachsen junger Sporangien zu vege-
30 tativen Hyphen, ganz unregelmäßige, auffällig große Sporen (15 zu 8—11 μ), abweichende Verzweigung u. a. sah z. B. KLEBS (1) bei vermindertem Luftdruck, auch in konzentrierterem Substrat. Mit
35 Rücksicht auf richtige Beurteilung der Formen ist es wichtig, derartige Abweichungen zu kennen. —

Als Gärungserreger bezw. Bildner von Kugelhefe werden von sonstigen Arten dieser
40 Gruppe nur *M. erectus* und *M. fragilis* genannt, deren Kennzeichen hier ohne weiteren Kommentar folgen mögen.

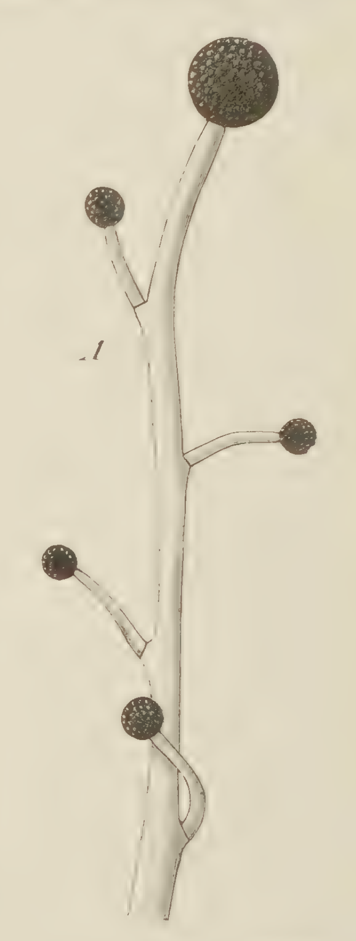


Fig. 109. Mucor racemosus. Verzweigung des Sporangienträgers. — Vergr. 120. Nach KLEBS.

Mucor erectus BAINIER (5) bildet bis 1 cm hohe, reich traubig verzweigte Sporangien-
45 träger (s. *Fig. 110*), die sich auf verschiedenen Vegetabilien (Brot, kranken Kartoffeln, Pflaumendekokt) finden. Die Wand der meist 80 μ (50—12 μ als Grenzen) dicken, gelblichgrauen, durchsichtigen Sporangien ist zerfließlich, glatt und hinterläßt einen Basalkragen. Ihre Sporen messen zwischen 5—10 μ zu 2,5—5 μ. Die Colu-
50 mella hat 40 μ (20—65 μ) im Durchmesser. Neben Zygosporen bildet die Art Azygosporen, feinstachlige Gemmen, Kugelzellen und Kugelhefe. Die gegebenen Maße (nach A. FISCHER) können anscheinend auch weit geringer ausfallen, die Zahlen BAINIER's (5), sowie J. SCHROETER's (1)

sind kaum halb so groß. Die Art soll nach E. Chr. Hansen (1) in Bierwürze 8 Proz. Alkohol erzeugen können.

Mucor fragilis Bainier (5) bildet gleichfalls kaum 1 cm hohe Rasen, doch mit schwarzen Sporangien an sonst ähnlichen Trägern. Die glatte, kaum inkrustierte Wand ist gleichfalls zerfließlich und hinterläßt einen Kragenrest. Columella und Sporen (4,2 μ zu 2,1 μ) sind etwas abweichend; ebenso die Zygosporen. Die Gärung in Zuckerlösungen soll durch Kugelhefe bewirkt werden. Der Pilz ist auf Leinsamenmehl und Pflaumenabkochung gefunden worden, aber wie der vorige praktisch bedeutungslos, systematisch auch wohl schärfer abzugrenzen. —



Fig. 110. Mucor erectus Bainier. *12*: Sporangienträger, *13*: Columella (links) und Sporangium (rechts). *14*: Kugelzellen. Vergr. von *12*: ca. 2, von *13*: 700, von *14*: 400. Nach Bainier.

An *M. racemosus* schließt eine zweite interessante Art dieser Gruppe an, die freilich in die pathologische Mykologie gehört und deshalb hier nur kurz zu erwähnen ist: sie weicht aber in Form und Bau des Sporangiums von allen Species der Gattung *Mucor* durch die aufsitzende Columella ab und ist, da eine Vereinigung mit *Rhizopus* wohl untunlich erscheint, dieserhalb zweckmäßig in eine besondere Gattung zu stellen: es ist der pathogene *M. corymbifer*, von Vuillemin (12) in eine neue Gattung *Lichtheimia* gestellt.

Mucor corymbifer Cohn (= *Lichtheimia corymbifera* Vuillemin), von Lichtheim (1) beschrieben, bildet niederliegende, mit mehreren Sporangien besetzte Träger. Das farblose Sporangium hat birnförmige Gestalt (gleichfalls eine Ausnahme!) und eine sonst nur in der Gattung *Rhizopus* und diesen nahestehenden Gattungen vorkommende Apophyse; nach älteren Angaben ist es im Mittel ca. 50 μ breit (Schwankungen zwischen 10 und 70 μ kommen vor), seine Wand ist glatt, farblos, zerfließlich, wobei gewöhnlich ein Kragenrest zurückbleibt. Die aufsitzende, farbige Columella (10—20 μ) bildet mit der Apophyse einen fast kugeligen bräunlichen Körper (ähnlich wie *Rhizopus*). Die länglichen Sporen messen nur 2 μ zu 3 μ, selten bis 4 μ zu 6,5 μ. Ueber Zygosporen, Gemmen und Kugelzellen ist nichts bekannt. Die Art ist auf bakteriologischen Nährböden, aber auch im menschlichen Ohr zufolge Siebenmann (1) beobachtet worden; sie rief bei Kaninchen tödliche Erkrankung hervor. Ihr Optimum liegt bei Blutwärme. Pathogen ist der Pilz nach Barthelat (1) nicht durch ein lösliches Produkt (Gift) sondern durch die zerstörende Wirkung auf das Gewebe zumal der Harnkanälchen in den Nieren.

Synonym ist damit nach früherer Meinung von A. Fischer (1) der *Mucor ramosus* Lindt sowie *Rhizopus ramosus* (Lindt, Zopf), jedoch verschieden davon der gleichfalls für Kaninchen pathogene *Mucor pusillus* Lindt vom Habitus eines gewöhnlichen *Mucor*, über die Näheres bei Fischer (1) nachzusehen ist.

Neuerdings wird übrigens *M. corymbifer* von Lucet und Costantin (2) in vier Arten („kleine Arten") aufgelöst: *M. Lichtheimi* (= *M. corymbifer* s. str.), *M. ramosus*, *M. Truchisi* und *M. Regnieri*. Die beiden ersten haben geringere Wärmeansprüche, *M. Truchisi* verträgt dagegen noch Temperaturen von 51—53°, dazwischen steht *M. Regnieri*. Diese zwei

neuen Arten stammten von erkrankten Pferden verschiedener Ställe, ihre Impfung auf Kaninchen rief ungefähr dieselben Erscheinungen hervor wie *M. corymbifer*, morphologisch weichen sie auch untereinander etwas ab. Die Ansicht, daß *M. ramosus* Lindt (= *Lichtheimia ramosa* Vuillemin) von *M. corymbifer* (= *Lichtheimia corymbifera* Vuillemin) verschieden ist, vertritt neuerdings auch Vuillemin (12); Columella und Sporen sind bei ihm größer.

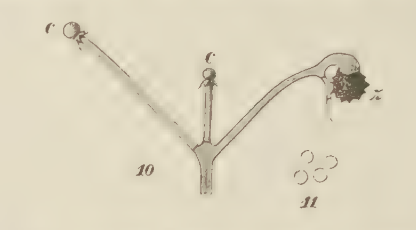


Fig. 111. *Mucor (Zygorhynchus) heterogamus* Vuillemin.
10: Sporangienträger mit Columella (*c*) und Zygospore (*z*), *11*: Sporen. Vergr. von *10*: ca. 90, von *11*: ca. 400. Nach Vuillemin.

Gleichfalls neuerdings aus der Gattung *Mucor* ausgeschieden worden ist der traubig verzweigte, aber durch abweichende Zygosporen charakterisierte einstweilen praktisch bedeutungslose frühere *Mucor heterogamus* Vuillemin, den sein Autor in die neue Gattung *Zygorhynchus* (Zygosporen geschnäbelt, sonst wie *Mucor*) als *Z. heterogamus* versetzt (s. *Fig. 111*). Außerdem enthält diese Gattung zurzeit den gleichfalls von Vuillemin (6) im Jahre 1903 beschriebenen *Z. Moelleri*. Auf beide sei trotz ihres wissenschaftlichen Interesses hier nur kurz hingewiesen.

Racemisch verzweigte Sporenträger haben endlich noch folgende zwei Arten:

Mucor exitiosus Massee, der Locust-fungus Südafrikas, parasitisch in Heuschrecken, diese abtötend, mit schwarzen Sporangien (60—100 μ) und ellipsoidischen Sporen (5—6 μ zu 3.5—4 μ) worüber Näheres bei Massee (1) und Mac Alpine (2) zu finden ist. Vergl. auch S. 489.

Mucor pusillus Lindt ist gleichfalls pathogen (für Kaninchen), aber auch von Miehe (1) bei der Braunheudarstellung (vergl. Bd. I, S. 618) in der ca. 40° warmen Heumasse beobachtet. Sporangienträger ungefähr 1 mm hoch mit fast schwarzen 50—80 μ dicken Sporangien und kugelrunden 3—3,5 μ großen farblosen glatten Sporen. Columella meist eiförmig, 50 μ zu 60 μ; die feinstachlige Sporangienwand hinterläßt gewöhnlich deutliche Kragenreste. Wachstumoptimum ca. 40° und deshalb als *Mucor* bemerkenswert.

§ 106. Mucor-Arten mit sympodial verzweigtem Sporangienträger (Sectio Cymomucor).

Die dritte Gruppe der *Mucor*-Arten, mit mehr oder weniger sympodial verzweigtem (cymösem) Sporangienträger, enthält zumal einige chemisch interessante Arten, die zum Teil im Gewerbe mitspielen. Der Sporangienträger ist freilich keineswegs immer notwendig oder deutlich sympodial, gelegentlich sogar auch unverzweigt, so z. B. bei *M. Rouxii*, *M. plumbeus* (= *M. spinosus*), *M. irkutensis*. Zwecks richtiger Bestimmung sind also Kulturversuche oft unumgänglich. Außer den genannten zählen hierher *M. Praini* Chodat et Nech., *M. javanicus* Wehm., *M. globosus* A. Fischer, *M. ambiguus* Vuill., *M. circinelloides* van Tiegh., *M. alternans* van Tiegh., *M. neglectus* Vuill., *M. brevipes* Riess, *M. heterosporus sibiricus* Schostak., *M. angarensis* Schostak., *M. Wosnessenskii* Schostak. als genauer beschriebene Species.

Mucor Rouxii (Calm.) Wehmer, besser wohl *M. Rouxianus* — wie auch schon von Vuillemin (4) hervorgehoben wurde — zu benennen, ist die wichtigste der hierher gehörigen Species. Das ist der Pilz, welcher seiner Zeit als gleichzeitiger Verzuckerungs- und Alkoholgärungs-Pilz ein allgemeineres Interesse erregte; mit ihm sollte der Spiritusbrenner die Stärke direkt in Alkohol überführen (s. 22. Kap.), industriell wurde er zuerst durch Boidin in Seclin ausgenutzt. Calmette (1) isolierte im Jahre 1892 die Art aus der sogen. Chinesischen Hefe (s. Bd. V, S. 320) und benannte sie, unsicher über die systematische Stellung, als *Amylomyces Rouxii*, d. h. einfach als Stärkepilz; weder Sporangien noch sonstige sporenbildende Organe zeigten sich zunächst. Auf Grund der von Calmette selbst reichlich gefundenen Gemmen (Chlamydosporen) hätte er richtiger den provisorischen Namen *Chlamydomucor Rouxii* (oder besser *Chl. Rouxianus*) erhalten müssen. Daß der Pilz eine Mucorinee, und zwar ein echter *Mucor* ist, wurde erst im Jahre 1900 durch Wehmer (1) gezeigt, welcher die zarten Sporangien auffand und genauer beschrieb, auch die Species den bereits bekannten gegenüber als neu kennzeichnete. Weitere Beiträge zum Studium dieses Pilzes sowie genauere Erörterung seiner Beziehung zu anderen Arten brachte bald darauf Vuillemin (4), ebenso teilte Turquet (1), übereinstimmend mit der bisherigen Literatur, noch mit, daß dieser Pilz Sporangien bildet. Eijkman (1) hatte bereits vorher in dem Glauben, daß der Pilz Calmette's mit den aus chinesischer Hefe herauswachsenden Sporangienträgern verschiedener *Mucor*-Arten identisch sei, ihn als *Mucor Amylomyces Rouxii* bezeichnet; dieser bisweilen gebrauchte Name ist aber schon auf Grund einer bei Eijkman fehlenden Beschreibung wissenschaftlich unberechtigt. Eijkman arbeitete nicht mit Reinkulturen, sondern hatte Gemenge der verschiedenartigen Mucorineen der chinesischen Hefe vor sich; was derselbe als angebliche *Amylomyces*-Sporangien photographierte, sind keine solchen des *M. Rouxii*.

Unser Pilz ist durch niedrige zarte Sporangienträger (s. *Fig. 112*) ausgezeichnet, die bald reichlich, bald spärlich erscheinen, nicht selten auch ganz fehlen, so daß dann nur feine sterile Decken von hellgold- bis orangegelber Farbe das feste Substrat überziehen; in Flüssigkeiten vegetiert er gewöhnlich als mehr oder minder voluminöses graues Mycel, das nur unter besonders zusagenden Bedingungen sich zu oberflächlichen gelben Decken verdichtet. Wenngleich er auf allen üblichen Substraten (Würze, gekochtem Reis, Würze-Agar u. a.) auch bei gewöhnlicher Temperatur (ca. 20°) unschwer zu züchten ist, so gedeiht er doch ungleich besser bei seinem oberhalb 30° liegenden Optimum, doch fallen die Vegetationen je nach Bedingung recht verschieden aus. Gegenüber Wehmer (1), der meist niedrige Träger, spärliche Vegetationen (auf Würze-Agar, Reis, Würze bei Zimmertemperatur) erhielt, erzielte Vuillemin (4) bei 30° auf Kartoffeln, Rüben, Malzgelatine ansehnliche, mehrere Millimeter hohe Sporangienrasen mit Trägern, die bis fünf und mehrere dunkle, mit feinen Nädelchen besetzte Sporangien aufwiesen. Ersterer sah nur kleine, kaum ein Millimeter hohe Träger mit 2—3 hellen glatten Sporangien entstehen. Das etwas abgeplattete Sporangium hat gewöhnlich ca. 50 μ im Durchmesser, variiert aber zwischen 20 und 100 μ. Die wechselnde Verzweigungsart zeigt beistehende Abbildung. Die zerfließliche oder brüchige, oft mit Nadeln inkrustierte Sporangienwand hinterläßt einen mit der Unterseite der Columella verwachsenen Kragenrest. Die Columella ist gleichwie das Sporangium selbst schwach abgeplattet-kuglig (12—18 μ, auch bis 40 μ im Durchmesser), glatt, oft

farblos; bei dunklen Sporangien (VUILLEMIN) ist der Sitz der Färbung nicht die Sporangienwand sondern die Columella und die Sporenmembran. Die Sporen sind bei dieser Art im großen und ganzen ziemlich gleichartig,

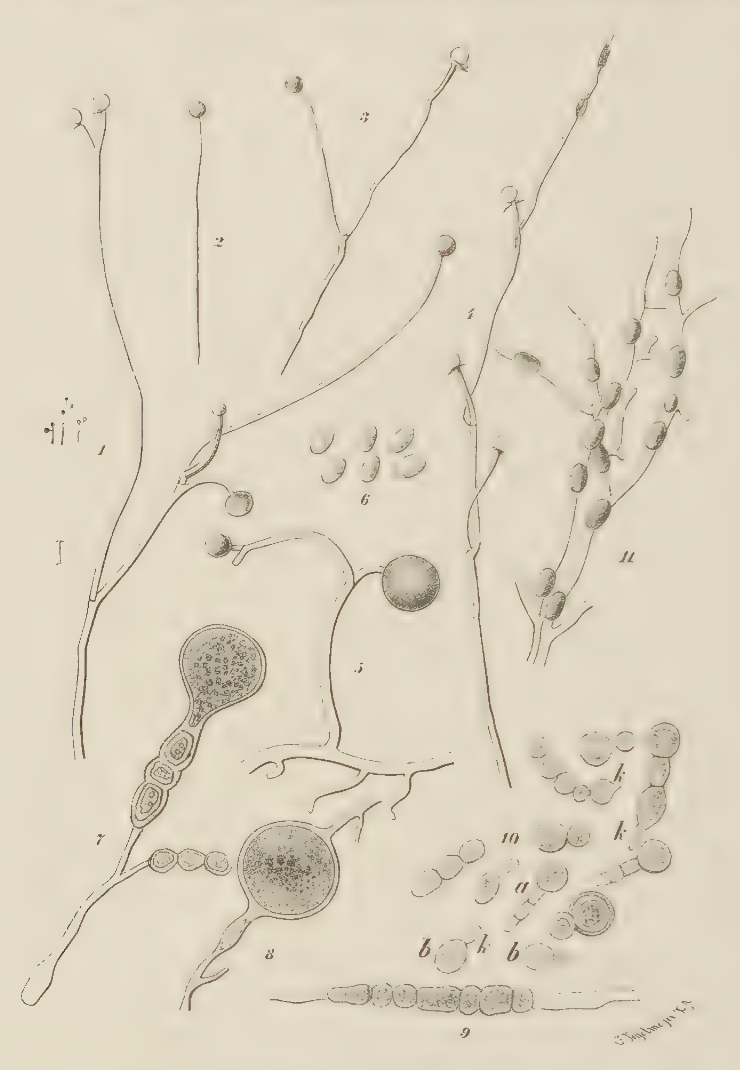


Fig. 112. Mucor Rouxii (CALM.) WEHMER.
1—5: Sporangienträger, *6*: Sporen, *7—9*: Gemmen (Chlamydosporen), *10*: Kugelzellen, teils mit wieder zerfallendem Keimschlauch austreibend (*a*), teils Knospen bildend (*b*), *11*: Gemmen. — Ungefähre Vergr. von *1—4*: 60, von *5*: 100, von *6*: 800, von *7—9*: 130, von *10*: 250. *1* (Hauptfigur) und *4* nach VUILLEMIN, *11* nach CALMETTE, das Uebrige nach WEHMER.

meist ellipsoidisch und ca. 5 μ lang bei 2,8 μ Dicke nach eigener Mes-
5 sung, nach VUILLEMIN 4–4,75 μ zu 3–3,5 μ, glatt, dünnwandig, farblos. Oxalatkristalle sah VUILLEMIN auch oft die vegetativen Hyphen bedecken; die von dem Pilz abgeschiedene freie Säure dürfte also Oxalsäure sein.

Chlamydosporen sah bereits CALMETTE als die einzigen besonderen Organe dieses Pilzes auf Gelatineplatten u. dgl. reichlich entstehen, ohne sie allerdings systematisch richtig zu würdigen. Bei sehr variabler Gestalt können sie bisweilen zu erheblicher Größe, bis 100 μ im Durchmesser, bei bis 7 μ Wanddicke, anwachsen (s. die Abbildung). Auch Kugelzellen können — entgegen früherer Meinung — reichlich aus submersen Hyphen entstehen und nachgewiesenermaßen — s. WEHMER (8) — sowohl zu Keimschläuchen auswachsen, wie auch spärliche Sprossungserscheinungen (Kugelhefe) zeigen; das läßt sich deutlich aber nur im EINHORN'schen Gärungssaccharometer (s. S. 435) feststellen. Anscheinend verwischt sich hier gelegentlich der Unterschied zwischen Gemmen und Kugelzellen, indem letztere in alten Kulturen und bei ausbleibendem Keimen durch Dickenwachstum der Wand usw. chlamydosporenähnliches Aussehen annehmen; das wäre noch genauer zu verfolgen.

Zygosporen sind bislang bei dieser Art nicht gefunden worden; besondere Versuche, sie zu erhalten, sind freilich auch nicht angestellt worden.

Häufig, zumal auf minder geeignetem Substrat (Agarnährböden), beobachtet man Mißbildungen der Sporangienträger; das Sporangium bleibt leer oder wächst vor erfolgter Sporenbildung vegetativ mit Keimschlauch aus. Derartigem Fehlschlagen (Durchwachsen) begegnet man bekanntlich auch bei anderen *Mucor*-Arten, es ist bei *M. racemosus* speziell von KLEBS (1) auch experimentell hervorgerufen worden.

Die Art verzuckert Stärkekleister und erregt in Zuckerlösungen — mit Ausnahme von Milchzucker, Rohrzucker u. a. — schwache Gärung (s. 22. Kap.). Die Gelatineverflüssigung (in 10-proz. Würzegelatine) ist sehr träge und bei 15—20° erst nach Wochen nachweisbar In Zuckerlösungen findet schwache Säuerung statt (s. oben). Das Verhalten gegenüber verschiedenen Zuckern im Vergleich mit *Rhizopus tonkinensis* und *Rh. japonicus* (s. S. 495) ist von SITNIKOFF und ROMMEL (1) geschildert worden: bei P. LINDNER (1) sind diese Daten tabellarisch zusammengestellt. Weitere physiologische Daten findet man bei CALMETTE (1), SITNIKOFF und ROMMEL (1), SANGUINETI (1), BOIDIN und ROLANTS (1), WEHMER (1). Hervorgehoben sei davon nach letzterem nur die intensive Färbung (orangegelb), welche die Kulturen auf gedämpftem Reis bei Zimmertemperatur annehmen und die auf reichlicher Entstehung eines gelben Oels innerhalb der Zellen beruht. Andere Species, soweit sie darauf geprüft sind, geben farblose Reiskulturen. Das zugrundeliegende Pigment ist von VUILLEMIN (4), der diese Erscheinung weiter verfolgte, in feinen Nädelchen kristallisiert erhalten worden. Bekanntlich kommt ein sehr ähnlicher gelber Farbstoff minder ausgesprochen auch bei mehreren anderen Mucorineen vor, chemisch scheint er noch nicht näher bekannt zu sein. Der neuerdings von CHODAT und NECHITCH zu Vergleichszwecken kultivierte *M. Rouxii* weicht zufolge NECHITCH (1) in einigen Punkten ab, zumal soll er Gelatine stark verflüssigen und auch bei 38° Pigment bilden; die genaueren Umstände für das Verflüssigungsvermögen (Konzentration der Gelatine, Zusammensetzung, Temperatur) sind freilich nicht mitgeteilt, es braucht also nicht notwendig eine so starke Variabilität des Pilzes angenommen zu werden. Uebrigens findet man in dieser Arbeit noch eine weitere Zahl von Einzelheiten bezüglich des physiologischen Verhaltens unseres Pilzes; eine kürzere Mitteilung von CHRZASZCZ (1) bringt sachlich nichts Neues.

Mucor Praini CHODAT et NECHITCH ist von den Autoren, wie

Nechitch (1) im Jahre 1904 berichtet, eine stärkeverzuckernde Art nach dem Direktor des Botanischen Gartens zu Calcutta benannt worden, welche sich in dem „levain du Sikkim“ — das sind der sogen. Chinesischen Hefe bezw. dem Ragi ähnliche Reismehlkuchen — neben andern Mikroorganismen vorfand. Sikkim ist eine indische Provinz am Himalaja; man benutzt jene „levains“ dort zur Bereitung eines alkoholischen Getränkes aus Reis. Die Art ist dem im folgenden noch zu besprechenden *M. javanicus* ähnlich. Ihre nicht sehr regelmäßig sympodial verzweigten Sporangienträger erreichen bis 4 cm Höhe und tragen bis 6 Sporangien, welche kuglig, glatt und durchscheinend, dabei gelb bis tiefbraun von Farbe sind und 35—70 μ im Durchmesser haben. Die Columella ist kuglig bis schwach oval, glatt, ungefärbt und von 45 μ zu 50 μ bis herab auf 25 μ zu 20 μ an Größe, mit deutlichem Kragenrest. Die Sporen messen 8 μ zu 6 μ in den großen Sporangien, bis herab auf 4 μ zu 3 μ in den kleinen; sie sind übrigens wenig regelmäßig, also nicht nur ellipsoidisch, sondern nach Angabe auch kuglig, übrigens glatt, farblos, dünnwandig wie die der meisten Arten. Zygosporen sind bislang nicht beobachtet worden, dagegen kommen Chlamydosporen wie Kugelzellen (Oidien) vor, erstere von sehr variabler Gestalt (oval, kuglig, birnförmig usw.) mit dicker, glatter, farbloser Wand; auch die Kugelzellen variieren wie sonst in Form und Größe (4—44 μ im Durchm.). Sprossungen scheinen bislang nicht beobachtet zu sein; das hängt aber, wie wir schon wissen, lediglich von den Umständen ab. Diese Art ist von Chodat und Nechitch vergleichend mit *M. Rouxii* kultiviert worden, wodurch eine Reihe bemerkenswerter Feststellungen auch nach der physiologischen Seite hin gemacht worden ist, die im Original nachgesehen werden müssen. Auf Reis maßen die Sporangienträger 4 cm, auf Würze-Gelatine 1,5 cm, auf Pepton-Agar waren sie kaum sichtbar. Am günstigsten war die Temperatur von 25°, bei 38° bildeten sich keine Sporangienträger mehr. Dunkelkulturen zeigten auf den verschiedenen Substraten durchweg nur 3—4 mm hohe Sporangienträger: der Pilz reagiert also sehr lebhaft auf Lichteinfluß. Gelatine wird sehr langsam verflüssigt, Gärungserscheinungen sind schwach. Milchzucker erwies sich als nicht ungeeignetes Substrat. Zumal die beiden letzten Merkmale würden die Art von *M. javanicus* merklich unterscheiden, so daß ein genaueres Studium nach dieser Seite, einschließlich des Verzuckerungsvermögens beider Pilze, dankbar wäre. —

Damit kommen wir zu einer Gruppe einander sehr ähnlicher *Mucor*-Arten, deren gegenseitige Beziehungen noch keineswegs ganz klar liegen. Mutmaßlich sind mehrere synonym, so daß die Zahl der Species auf 1—2 zu vermindern wäre; erst durch erneuertes Studium, zumal auch der physiologischen Eigenschaften, wäre das festzustellen. Es sind das *M. javanicus*, *M. ambiguus*, *M. circinelloides* und *M. alternans*.

Mucor javanicus Wehmer (2) ist gleichfalls eine aus ostasiatischem Reismehlkuchen (Ragi von Java) im Jahre 1900 isolierte Art (s. *Fig. 113*), die neben *M. Rouxii* und anderen einen beträchtlichen Anteil der Keime ausmachen kann. Schnelles Wachstum und ausgesprochenes Gärvermögen zeichnen sie vor vielen andern *Mucor*-Arten aus; daß sie auf Grund dieses auch bei der Vergärung der Reismaischen mitwirkt, ist wohl anzunehmen. Von den sämtlichen Species ist sie jedenfalls morphologisch wie gärungsphysiologisch mit am besten bekannt. In mancher Beziehung erinnert sie, wie schon bemerkt, an *M. alternans*, *M. ambiguus* und *M. circinelloides* (s. S. 486); gegenüber *M. Rouxii* bildet sie, zumal auf

festem Substrat (Reis), ansehnliche, bis 1—3 cm hohe, dichte Sporangienrasen von graugelblicher bis hellbrauner Farbe, während auf Flüssigkeiten (Würze) die Träger gewöhnlich zu unansehnlichem Gewirr zusammensinken. Die kleinen kugligen orangegelben bis gelblichbraunen glatten oder auch feinstachligen transparenten Sporangien, zu 3—5 und mehreren auf den deutlich cymösen Trägern, nehmen nach der Spitze hin an Größe ab (von 50 μ Durchm. bis auf ca. 18 μ sinkend); ebenso sinkt der Durchmesser der gewöhnlich kugligen hellen Columella entsprechend von 35 μ auf ca. 10 μ. Die zerfließende oder zerbrechende



Fig. 113. Mucor javanicus Wehmer.
1: Sporangienträger, *2*: Columella, *3*: Sporangium, *4*: Sporen, *5*: Gemmen (Chlamydosporen), *6*: Kugelzellen (Oidien) noch im Verband, *6a*: Kugelzellen isoliert (aus dem Gärungssaccharometer) sowohl mit wieder zerfallenden Keimschläuchen auskeimend wie Knospen bildend (Kugelhefe). — Ungefähre Vergr. von *1*: 100, von *2* u. *3*: 300, von *5* u. *6*: 200. Nach Wehmer.

Sporangienwand hinterläßt in der Regel einen deutlichen Kragenrest. Sehr ungleich sind die fast farblosen Sporen in Form wie Größe (Mittelmaß 5—7 μ zu 4—5 μ). Zygosporen wurden bislang nicht gefunden, dagegen kommen Gemmen wie besonders Kugelzellen stets und reichlich vor; zumal zur Bildung letzterer neigt die Art in besonderem Maße, so daß schon in gewöhnlichen Kolbenkulturen ganze Hyphensysteme nesterweis in Zerfall gefunden werden. Gewöhnlich sieht man diese in alsbald wieder zerfallende kurze Keimschläuche austreiben; bei längerer Behinderung des Luftzutritts (so im Einhorn'schen Gärungssaccharometer oder besser noch unter Gärverschluß) findet man daneben auch reichlich sprossende Kugelhefe, bei deren Auftreten aber die Gärung schon lange in Gang ist. Diese ist also keineswegs von der „Hefenbildung“ abhängig, das Mycel an sich, sowohl submers wie oberflächlich wachsend, erregt bereits Gärung. Auch diese Art liebt eine höhere Temperatur (Optimum ca. 37 °), gedeiht und gärt aber schon gut bei 15—20 ° C. Die Alkoholgrenze liegt (in Bierwürze) bei ca. 5—6 Proz., gleichgültig ob der Luftzutritt abgeschlossen oder die Flüssigkeit

reichlich mit Luft versorgt wird. Genauere Ermittelungen hierüber findet man bei WEHMER (7); man vergl. darüber das 22. Kapitel. Auf flüssigen wie festen Substraten (gekochtem Reis, Würze mit und ohne Agar oder Gelatine, Stärkekleister, Zuckerlösungen mit Mineralsalzen) 5 ist diese Art leicht kultivierbar und wächst noch bei 40°. Die Gelatineverflüssigung ist meist sehr träge, erst nach Wochen wahrnehmbar (10-proz. Würzegelatine bei 15°). Dextrose, Rohrzucker, Malzzucker sind gute, Milchzucker ist ein schlechter Nährstoff, bei der Verarbeitung entsteht durchweg eine Spur fixer organischer Säure unbekannter Art. Das 10 Verzuckerungsvermögen ist bislang nicht näher verfolgt, aus dem guten Gedeihen auf Reis und Stärkekleister ergibt sich aber schon die Fähigkeit zur Stärkelösung, welche ja bei Mucorineen weit verbreitet ist.

Ob der in einzelnen Punkten etwas abweichende *Mucor dubius* WEHMER (7) als besondere Species gelten darf, erscheint fraglich. Der 15 Vergleich dieser zwei Formen zeigt in deutlicher Weise die Schwierigkeit, selbst durch Kultur nebeneinander zwei einander ähnliche *Mucor*-Formen morphologisch sicher zu unterscheiden.

Mucor circinelloides VAN TIEGHEM wurde im Jahre 1875 zuerst beschrieben und als Gärungserreger schon im Jahre 1878 von GAYON (1) 20 studiert. Er bildet bis 1 cm hohe dunkelgraue Rasen, deren sympodial verzweigte Sporangienträger (s. *Fig. 114*) eine 25 wechselnde Zahl oft nickender kugliger graubrauner Sporangien tragen, von denen, geradeso wie bei *M. javanicus*, 30 die unteren größer und durch ihre feinkörnig inkrustierte zerfließliche Wand von den oberen mit fester nicht in- 35 krustierter Membran verschieden sind. Die Sporen sollen kuglig bis ellipsoidisch sein (3 μ zu 4—5 μ), auch sind Zygo- 40 sporen wie Gemmen beschrieben worden. Der auf Pferdemist und faulenden Kartoffeln beobachtete Pilz bildet in gärfähigen Zuckerlösungen sprossende Kugel- 45 zellen. Näheres über diese Species ist in den Arbeiten früherer Forscher, deren Angaben im Einzelnen aber nicht immer übereinstimmen, nachzusehen. So sind z. B. nach VAN TIEGHEM (2) sowie VUILLEMIN (4) die Sporen nicht kuglig (4—5 μ zu 3 μ); auch GAYON (2) läßt sie oval sein (4—5 μ zu 2—3 μ). BAINIER (5) gibt sie aber als kuglig an (ohne 50 Maße), LÉGER (1) fand beides. Vielleicht handelt es sich da also nicht immer um denselben Pilz. Ueber diese Unterschiede zugleich mit Rücksicht auf die folgenden Arten vergleiche man auch WEHMER (2). Da, gleichwie diese, unser Pilz als Alkoholgärungserreger nur rein wissen-

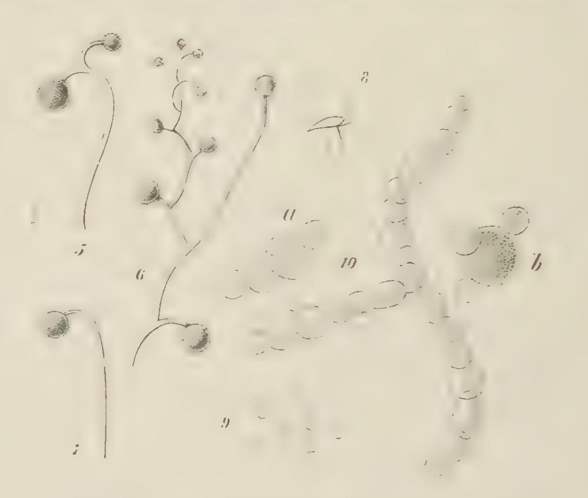


Fig. 114. *Mucor circinelloides* VAN TIEGHEM. *5, 6, 7*: Sporangienträger, *8*: Columella, *9*: Sporen, *10*: Kugelzellen, bei *b* sprossend (Kugelhefe). — Ungefähre Vergr. von *5—7*: 100, von *8*: 300, von *9*: 500, von *10*: 400. Nach GAYON und DUBOURG.

schaftliches Interesse besitzt, mag das zu seiner Charakterisierung genügen. Im 22. Kapitel wird noch auf ihn zurückzukommen sein. Rohrzucker wird nach GAYON (1) nicht vergoren (Invertin fehlt!).

Mucor alternans VAN TIEGHEM war der erste *Mucor*, dessen Dextrin-Vergärungsvermögen im Jahre 1887 von GAYON und DUBOURG (11) erkannt und studiert wurde. Die niedrige Rasen bildenden wickligsympodial verzweigten Sporangienträger (s. *Fig. 115*) tragen bis zu 12 kuglige Sporangien, deren Größe nach oben successiv abnimmt; nur die unteren besitzen zerfließende, die oberen dagegen eine feste Wand. Die ellipsoidischen Sporen messen 5—6 μ zu 2—3 μ. Gemmen und Zygosporen sind von der auf Mist gefundenen, in zuckerhaltigen Flüssigkeiten Gärung erregenden, sprossende Kugelzellen bildenden Art bislang nicht angegeben worden. Nur Dextrose, nicht Rohrzucker, wird vergoren; s. GAYON und DUBOURG (1). Diese durch VAN TIEGHEM im Jahre 1887 aufgestellte Species ist wahrscheinlich mit dem schon ein Jahr vorher beschriebenen *Mucor ambiguus* VUILLEMIN synonym (s. unten). Auch die Unterschiede gegen *M. circinelloides* sind wenig präcise; man vergleiche dazu WEHMER (2), sowie VUILLEMIN (4).



Fig. 115. Mucor alternans VAN TIEGHEM.
1 u. *2*: Sporangienträger, *3*: Sporen, *4*: Kugelzellen, bei *a* sprossend. — Ungefähre Vergr. von *1*: 100, von *2*: 200, von *3*: 450, von *4*: 340. Nach GAYON.

Mucor ambiguus VUILLEMIN (2), im Jahre 1886 beschrieben, ist dem *M. alternans* nach eigner Angabe VUILLEMIN's (4) so ähnlich, daß eigentlich nur die physiologischen Eigenschaften dem *M. alternans* noch Existenzberechtigung geben; für *M. ambiguus* ist darüber bislang eben nichts bekannt. Er bildet dunkle Rasen mit kaum ein Millimeter hohen sympodial verzweigten, 4—5 Sporangien tragenden Trägern; untere und obere Sporangien zeigen wieder die gleichen Unterschiede hinhinsichtlich Größe und Wandbeschaffenheit wie bei den vorigen Arten. Die Sporen sind ca. 7 μ lang bei annähernd 4,5 μ Dicke, voraussichtlich mit den üblichen, bei allen diesen Arten vorkommenden Schwankungen; ihre Membran ist durch feine Nädelchen rauh. Zygosporen sind unbekannt, doch kommen Gemmen wie Kugelhefe vor. Ist auf Brot gefunden worden.

Auf Grund eines charakteristischen Merkmals von allen anderen Arten leicht unterscheidbar ist endlich

Mucor plumbeus BONORDEN, der spätere *Mucor spinosus* VAN TIEGHEM, kenntlich an den dornigen Auswüchsen der — bei allen andern *Mucor*-Arten glatten — Columella. Uebrigens kommen zu diesem Merkmal noch zwei weitere: kuglige Sporen und bleigraue Farbe der Rasen; fast alle übrigen Species (Ausnahmen s. S. 471) besitzen deutlich gestreckte Sporen bei ins Gelbliche gehender Färbung der grauen Rasen, so daß beispielsweise die Würze-Kulturen dieser Art (nach eigner Feststellung) von denen des *M. Mucedo*, *M. Rouxii*, *M. javanicus*, *M. piriformis* deutlich verschieden sind. Diese bleigraue Färbung ist nicht minder

charakteristisch als die Columella-Auswüchse, weshalb gerade der alte, die Priorität besitzende BONORDEN'sche Name sehr bezeichnend ist. Die Verzweigung der bis ein Centimeter hohe Rasen bildenden Sporenträger ist weniger regelmäßig als bei den vier vorhergenannten Arten, bisweilen auch monopodial und fehlt oft ganz (s. *Fig. 116*). Die Sporangien sind braunschwarz, kuglig, bis 100 μ im Durchmesser, ziemlich gleichartig, mit zerfließender, von Nädelchen inkrustierter Wand, die gewöhnlich kleinen Kragenrest hinterläßt. Die Columella ist oval bis langgestreckt, wenig regelmäßig, bräunlich, bis gegen 90 μ hoch, die meisten Exemplare (nicht alle) mit verschieden gestalteten sparsamen oder zahlreichen Auswüchsen. Zufolge A. FISCHER (1) haben die kugligen Sporen 5—8 μ bezw. 9 μ im Durchmesser und sind glatt, nach eigenem Material sind sie durch feine Körnchen oder Nädelchen rauh, und von meist 6 μ im Durchmesser (Grenzen 4,8—7,2 μ), somit für einen *Mucor* auffällig gleichartig. Die Art bildet Zygosporen, reichlich Gemmen (Chlamydosporen), auch Kugelzellen und Kugelhefe (bei Luftabschluß), und erregt schwache Alkoholgärung in Dextroselösung; Rohrzucker wird nach GAYON (1) nicht invertiert. Sie findet sich als feiner Schimmelrasen auf Brot, gekochten Kartoffeln, Pferdemist und andern derartigen Substraten, ist auch leicht



Fig. 116. *Mucor plumbeus* BON. (*M. spinosus* v. TIEGH.). *11* u. *12*: Sporangienträger. *13*: Columella. *14*: Kugelzellen. *15*: Kugelzellen mit Knospen bezw. Keimschläuchen. *16*: Sporen. *17*: Gemmen in vegetativen Hyphen, Sporangienträgern und in der Columella. — Ungefähre Vergr. von *11*: 60, von *12*: 100, von *13*: 240, von *14* u. *15*: 340, von *16*: 500, von *17*: 250. *11—15* nach GAYON, *16* u. *17* Original (Würzekultur).

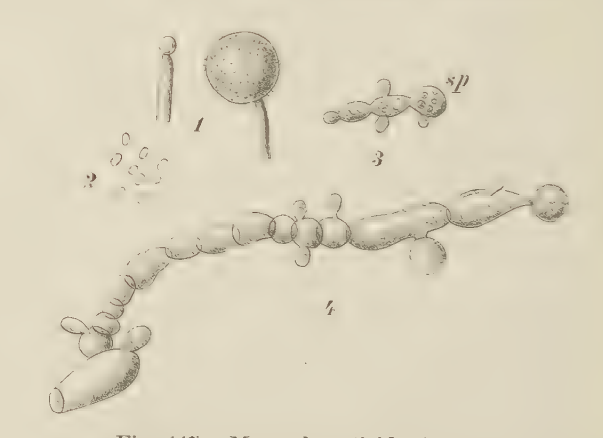


Fig. 117. *Mucor locusticida* LINDAU. *1*: Junges und reifes Sporangium, *2*: Sporen, *3*: Sproßzellen bildende Spore, *4*: Hyphe in Kugelzellen zerfallend mit Hefen-Sprossung. — Vergr. von *1*: 450, von *2* u. *4*: 330, von *3*: 900. Nach LINDAU.

kultivierbar. Zur Morphologie vergleiche man Bainier (5), sowie Vuillemin (2), Gayon (1) und Zopf (1), dessen *Mucor aspergilloides* nach Fischer (1) mit *M. plumbeus* synonym ist.

Von sonstigen Species der Sectio *Cymomucor* ist über Gärvermögen oder Bildung von Kugelhefe nichts bekannt. —

Von Lindau (1) ist ein *Mucor locusticida* als wahrscheinlicher Erreger der südafrikanischen Heuschreckenkrankheit beschrieben worden; die fehlende Columella (s. *Fig. 117*) schließt diese Art jedoch von der Gattung *Mucor* aus, sie wäre wohl richtiger als *Mortierella locusticida* zu bezeichnen. Der Pilz ist von Rickmann und Kaesewurm (1) zur Bekämpfung der Heuschreckenplage in Ost- und Südwestafrika angewandt worden. Möglicherweise handelt es sich also überhaupt um den *Mucor exitiosus* Massee (s. S. 480). Uebrigens findet sich als „Locust-fungus" schon 1902 ein *M. Acridii* Edington in der Liste des Král'schen Laboratorium.

§ 107. Die Arten der Gattung Rhizopus.

Die Gattung selbst ist bereits auf S. 464 charakterisiert worden. Die Speciesunterscheidung begegnet ähnlichen Schwierigkeiten wie bei *Mucor*. Wenngleich eine größere Zahl von Arten beschrieben ist, so fällt eine wirkliche Unterscheidung doch schwer; denn tatsächlich sind wir über den Wert der morphologischen Merkmale noch nicht ausreichend orientiert und kennen auch den Umfang der Variabilität dieses oder jenes Organes (Sporengröße u. a.) nicht genügend. Sporangienträger, Sporangium mit Columella und Sporen unterliegen hinsichtlich Form und Größe bei derselben Species beträchtlichen Schwankungen, erst eine vergleichende Bearbeitung an der Hand von Kulturen würde auch hier Klärung bringen. Vor allem wären auch in weitem Umfange physiologische Merkmale zur Charakterisierung heranzuziehen, die Morphologie läßt meistens in Stich.

A. Fischer (1) unterschied rund 9 Species als einigermaßen sichergestellt, aber auch von diesen scheinen noch mehrere — wie z. B. der *Rh. elegans* — kritisch, zumal wäre der Wert der Größenmerkmale hier für die Unterscheidung sicherzustellen. Zu diesen kommen dann weiter rund 14 später aufgestellte Arten. Als spezifische Unterscheidungsmerkmale wurden früher Form, Größe und Oberflächenbeschaffenheit der Sporen, mehr oder minder deutliche Gliederung der Ausläufer, Größe, etwaige Verzweigung, auch Zahl der Sporangienträger sowie Größe nebst Gestalt von Sporangium und Columella herangezogen. Inwieweit das alles für den speziellen Fall konstant ist, bliebe noch kulturell zu prüfen. Einige physiologische Kennzeichen (Verhalten gegen Zuckerarten, Wachstumsoptimum u. a.) sind erst durch neuere Arbeiten genauer verfolgt worden. Jedenfalls ist die Zahl der *Rhizopus*-Arten angenehmerweise weit geringer als die der *Mucor*-Arten.

Im übrigen sind sie gerade wie diese verbreitete Schimmelerreger auf Vegetabilien, zumal stärkereichen Stoffen (Mehl, gekochte Kartoffeln und Reis); einzelne erregen auch Fruchtfäule (*Rh. nigricans*) oder sind für Tiere pathogen (*Rh. Cohnii*, *Rh. equinus*), unser besonderes Interesse haben zumal mehrere im Gärungsgewerbe (Stärkeverzuckerung) tätige Arten (*Rh. Oryzae*, *Rh. japonicus*, *Rh. tonkinensis*, *Rh. oligosporus*, *Rh. chinensis*, *Rh. Tritici*, *Rh. Tamari*), die meist gleichzeitig Alkoholgärungserreger sind. Bei der Taurotte des Hanfs ist *Rh.*

nigricans mit tätig. Alle näher darauf geprüften Arten haben gegenüber den meist niedere Wärmegrade vorziehenden *Mucor*-Arten ein höher liegendes Wachstumsoptimum (über 30° C.).

Die älteren Arten gruppierte FISCHER (1) in zwei Abteilungen: 5 1. Mit unregelmäßig geformten Sporen, Oberfläche derselben gestreift: *Rh. nigricans*, *Rh. arrhizus*, *Rh. microsporus*, *Rh. minimus*, *Rh. reflexus*, *Rh. circinans*; die zwei letzten dieser Species mit nickenden Sporangien. 2. Mit kugligen Sporen, deren Oberfläche glatt oder stachlig ist: *Rh. echinatus*, *Rh. elegans*, *Rh. Cohnii*.

10 Zur ersten Abteilung mit nicht streng kugligen Sporen sind auch die späterhin beschriebenen (*Rh. Oryzae*, *Rh. japonicus*, *Rh. tonkinensis*, *Rh. nodosus*, *Rh. oligosporus*, *Rh. Tritici*, *Rh. chinensis*, *Rh. Cambodja*) zu stellen, sämtlich mit aufrechten Sporangien, hochliegendem Wachstumsoptimum und kaum sicher oder ohne weiteres voneinander zu unter- 15 scheiden. Beschrieben sind dieselben von WENT und PRINSEN GEERLIGS (1), BOIDIN (1), CHRZASZCZ (1), SAITO (1 u. 3), NAMYSLOWSKI (1), VUILLEMIN (4). Ihnen schließt sich noch der pathogene *Rh. equinus* von COSTANTIN und LUCET (1) sowie verschiedene meist auf Vegetabilien beobachtete Arten, so von MAC ALPINE (1) der *Rh. apiculatus* und der *Rh. schizans*, von A. 20 L. SMITH (1) der *Rh. umbellatus* und von RACIBORSKI (1) der *Rh. Artocarpi* an, nahezu alle in den letzten fünf Jahren aufgestellt. Dies ist eine Gruppe von Rhizopeen, bei deren Unterscheidung der Systematiker die Segel streicht, präzise Trennungsmerkmale sind zur Zeit kaum anzugeben; mutmaßlich sind mehrere synonym, möglicherweise handelt es 25 sich auch um Formen einiger weniger Arten, über die nur durch direkten Vergleich Sicheres auszusagen ist. Nur für vier derselben liegt bislang der Versuch einer Festlegung der gegenseitigen Beziehungen von VUILLEMIN (4) vor. Alle diese neuen „Arten" besitzen gleichwie *Rh. nigricans*, neben mehr oder minder unregelmäßig verzweigten 30 Sporenträgern, einfache unverzweigte, wie sie der Stolo oder wenn man will, die Sporangienstandsachse bei Berührung des Substrats neben Hafthyphen entwickelt (s. S. 465). Das macht, in Verbindung mit der Verschiedenartigkeit des Bildes schon bei derselben Species, die Verhältnisse so ungemein schwer übersehbar. Der Wert der von den ver- 35 schiedenen Autoren angegebenen morphologischen Unterscheidungsmerkmale bleibt für den Einzelfall noch genauer zu prüfen: wir müssen uns im folgenden darauf beschränken, diese einfach zu registrieren. In großen Zügen ist die Morphologie bei allen die gleiche. Eigenartige Mißbildungen in Gestalt kugliger oder gestreckter Anschwellungen treten 40 überall am Stiel des Sporangienträgers auf: man vergleiche dazu insbesondere auch die Abbildungen bei VUILLEMIN (4), sowie SITNIKOFF und ROMMEL (1).

Wir können uns hier nur mit den praktisch wichtigeren beschäftigen, von denen *Rh. nigricans*, *Rh. Oryzae*, *Rh. tonkinensis* und *Rh. javanicus* 45 bekannter sind, indes *Rh. oligosporus*, *Rh. Cambodja*, *Rh. Tritici*, *Rh. Tamari* und *Rh. chinensis* bislang nur je einmal untersucht wurden.

Rhizopus nigricans EHRENBERG, im Jahre 1818 zuerst als *Mucor stolonifer* EHRENBERG beschrieben, ist eine der gemeinsten Schimmelformen auf vegetabilischen Substraten (Pflanzenteile, Brot, gekochte Kartoffeln, 50 desgl. Reis, konservierte Früchte u. a.), mit seinen zarten schneeigen Fäden (Stolonen) die Oberfläche spinnwebartig überziehend und oft weit auf die Umgebung übergreifend, an den Gefäßwänden emporkletternd oder auch in abgeschlossener feuchter Luft dichte fädige Massen anfangs weißer später

dunkel graubrauner Farbe bildend. Ueberall treten die zierlichen kugelrunden zur Reifezeit schwarzen Sporenköpfchen (s. *Fig. 118*) auf kurzen starren Stielen deutlich hervor. Nie bildet diese, und zwar ebensowenig wie andere Mucoraceen-Arten, dichtverflochtene derbere Decken von Art der Aspergillaceen-Vegetationen, zumal *Rhizopus*-Arten treten immer nur in zarten fädigen Rasen auf; ihr innerhalb des Substrats wachsendes Mycel bildet gleichfalls sehr lockere Hyphenmassen. Nachteilig tritt unser Pilz als Fäulniserreger reifer, meist verletzter Früchte auf, mit Vorliebe besonders Tomaten, Gurken, Pfirsiche, doch auch Birnen, Mirabellen, Johannisbeeren u. a. befallend und in kürzester Zeit die ganze Frucht um- und durchwachsend (s. Bd. V, S. 38 u. f.); nach J. BEHRENS (2) wirkt er auf die Fruchtzellen durch ein von ihm gebildetes hitzebeständiges Gift abtötend. Nach demselben Forscher beteiligt sich der Pilz ebenfalls bei der Hanfrotte, speziell der Taurotte (s. Bd. III, S. 280), hier die Mittellamelle auflösend, Cellulose aber nicht angreifend; vergl. BEHRENS (1). Er ist nach P. LINDNER (1) einer der häufigsten Malzschimmel. NORDHAUSEN (1) sah experimentell infizierte, im Verblühen begriffene Tulpenpflanzen durch ihn zugrunde gehen. J. BEHRENS (2) gelangen Infektionen von Blättern und Sproßen succulenter Pflanzen (*Sempervivum*, *Mesembryanthemum*, *Opuntia*, *Stapelia*) jedoch nicht; diesem zufolge ist er ausschließlicher Fruchtparasit.



Fig. 118. *Rhizopus nigricans* EHRENBERG.
1: Der Ausläufer (Stolo) erzeugt an einer senkrechten Glaswand Rhizoiden neben unverzweigten Sporangienträgern. *2* u. *3*: verzweigte Sporangienträger direkt aus dem Substratmycel hervorgehend, d. h. der „Stolo“ erzeugt hier an seiner Spitze mehrere mit Sporangien abschließende Zweige. *4*: Sporangium, *5*: Columella und Apophyse, *6*: eine Spore (stark vergrößert), das faltige Rhizopus-Epispor zeigend. *7*: Sporen bei schwächerer Vergrößerung (300). — Ungefähre Vergr. von *1* u. *2*: 8, von *3*: 20, von *4* u. *5*: 50, von *6*: 1200, von *7*: 300. *2* u. *7* nach WEHMER, *3* u. *6* nach VUILLEMIN, das Uebrige Original.

Die kleinen 100—300 μ im Durchmesser haltenden, anfangs schneeweißen später schwarzbraunen bis schwarzen S p o r a n g i e n entstehen vorzugsweise auf starren 0,5—4 mm hohen Stielchen an den durch Kontakt mit festen Gegenständen gereizten Spitzen der Stolonen, büschlig in kleineren Gruppen von 2—6, unterhalb deren eine mehr oder minder reichliche Entwicklung von Hafthyphen (Rhizoiden) stattfindet (einfache Sporangienträger). Seltener findet man sie an der Spitze aufrechter

nicht gereizter gegen 1 cm hoher Hyphen, einzeln oder zu mehreren an kurzen, meist wirtelig gestellten Auszweigungen (verzweigte Sporangienträger); ob das eine oder andere eintritt, hängt offenbar von den Umständen ab. Man vergleiche hierzu auch *Fig. 106, 4—7.* In älteren Diagnosen ist das Vorhandensein der letztgenannten Träger meist übersehen worden; wie schon auf S. 490 hervorgehoben wurde, finden sie sich in eben derselben Weise bei den folgenden Species. Da der Stolo nach Erzeugung einer Sporangienträgergruppe nebst Rhizoiden im Bogen weiterwachsen kann, und weil das unter sonst zusagenden Verhältnissen sogar wiederholt geschieht, so klettert der Pilz leicht auch an senkrechten Wänden bis decimeterhoch empor. Zwingt man die Ausläufer durch Umkehrung des Kulturgefäßes senkrecht abwärts zu wachsen, so sollen bis 17 cm lange, mit einem einzigen Sporangium abschließende Sporangienträger entstehen können; man vergleiche darüber Wortmann (1), der sich im Jahre 1881 näher mit dem eigentümlichen Verhalten der durch unregelmäßige Nutationen (s. Bd. I, S. 467) gleichsam umhertastenden Stolospitze beschäftigte. Aber auch bei senkrechtem Aufwärtswachsen liefert das sonderbare Organ nicht notwendig eine Anzahl terminaler Sporangien, es können seine Zweige vielmehr teilweise oder sämtlich steril bleiben, sich auch wieder verzweigen: da spielen die Umstände jedenfalls stark mit, worüber auch Wehmer (3 u. 5), Vuillemin (4) zu vergleichen sind. Alles dies wiederholt sich in ganz derselben Weise bei den anderen *Rhizopus*-Arten.

Die Columella sitzt der Apophyse gewöhnlich breit auf: ihre Dimensionen schwanken nach denen des Sporangiums (70 μ zu 90 μ bis 250 μ zu 320 μ einschließlich Apophyse gemessen), dessen dunkle Wand hart und brüchig ist. Wenig Uebereinstimmung herrscht in der Literatur hinsichtlich der Sporen, deren Durchmesser allerdings variiert, nach Vuillemin (4) aber im Mittel über dem der beiden folgenden Species steht; am häufigsten fand derselbe solche von 12 μ Länge bei 8 μ Dicke, solche von 9 μ zu 7,5 μ gehörten zu den kleinsten, nicht selten fanden sich auch solche von 15 μ zu 11 μ. Andere Untersucher fanden 10—15 μ zu 11 μ (Schroeter), 14 μ zu 11 μ (van Tieghem), 6—17 μ als Grenzen (A. Fischer), 8—10 μ im Durchschnitt (Wehmer). Ihre Gestalt ist länglichrund bis eckig, die Farbe ist unter dem Mikroskop lichtgrau, ihre Wand relativ derb. Das Exospor ist nach Vuillemin (4), der diesem Punkte für die verschiedenen Species besondere Aufmerksamkeit widmete und mit sehr starken Vergrößerungen (ca. 2000) arbeitete, von zahlreichen feinen Falten bedeckt, also nicht glatt oder mit leistenförmigen Verdickungen versehen, wie sonst angenommen wurde. Uebrigens entwirft Namyslowski (1), der die Species ganz neuerdings (1906) untersuchte, wieder eine etwas andere Beschreibung der Oberfläche dieser von ihm sogar zu 12—20 μ im Durchmesser gemessenen Organe.

Der Pilz war bis vor kurzem (heute sind es deren vier) der einzige *Rhizopus*, von dem man Zygosporen kannte. Es sind dies kuglige bis tonnenförmige, braunschwarze, warzige Organe von 160 bis 220 μ Durchmesser, die wiederholt beobachtet und mit Rücksicht auf ihre Entstehungsbedingungen untersucht worden sind; man vergleiche darüber die Arbeiten von A. de Bary (2), van Tieghem (2), Eidam (1), Wevre (1), Coker (1), Blakeslee (1 u. 3) und Namyslowski (1). Genaueres findet man darüber bei Blakeslee, demzufolge ihre Entstehung nur aus Hyphen stattfindet, welche zwei verschiedenen Mycelien angehören, an dem aus einer einzigen Spore hervorgegangenen Mycel

also ausbleibt (heterothallische Species). NAMYSLOWSKI (1) hält das freilich nicht für erwiesen und macht ähnlich früheren Untersuchern die allgemeinen Entwicklungsbedingungen physikalischer und chemischer Art dafür verantwortlich; er erhielt Zygosporen ebenfalls an dem aus einer Spore hervorgegangenen Mycel. Diese Frage bedarf also weiterer 5 Klärung. Auch Azygosporen können entstehen. Chlamydosporen und Kugelzellen sind bislang kaum beobachtet worden; falls sie sich wirklich nicht finden, läge darin mit ein Unterschied gegen *Rh. Oryzae* u. a., wo beiderlei Organe nicht spärlich vorkommen.

Alle Zellwände des Pilzes neigen im Alter zu einer helleren oder 10 dunkleren Braunfärbung. Mißbildungen der Träger kommen zumal unter ungünstigen Wachstumsverhältnissen vor (zu hohe Wachstumstemperatur). Auch Vegetationen, die lange oder dauernd steril und schneeweiß bleiben, begegnet man gelegentlich. Ueber das Wachstumsoptimum scheinen genauere Bestimmungen nicht vorzuliegen, nach VUIL- 15 LEMIN (4) erträgt er Temperaturen über 30° hinaus schlecht, das ist aber keineswegs allgemein gültig, denn nach eignen Feststellungen entwickelt er sich auf Würze z. B. schneller bei ca. 37° als bei 20°, indes auf Dextrose mit Mineralsalzen das Umgekehrte der Fall war. Ueber seine Wirkungen ist, mit Ausnahme dessen, daß er, zufolge BARTHELAT (1), 20 nicht pathogen ist, wenig Genaueres bekannt, doch bildet er diastatische, peptische und tryptische Enzyme, säuert zuckerhaltige Substrate schwach an u. a.; man vergleiche das 22. Kapitel. Auch etwas Alkohol entsteht in zuckerhaltigen Flüssigkeiten, ohne daß es zu Gärungserscheinungen kommt. Rohrzucker vermag er nicht zu invertieren. 25

Vielfach ist dieser Pilz zu physiologischen Experimenten herangezogen worden. So stellte A. SCHRÖTER (1) die Abhängigkeit seiner Protoplasmaströmung von osmotischen und Transpirationsvorgängen, O'BRIEN (1) den nachteiligen Einfluß schon von niederen Wärmegraden (45—60°) fest. GÜNTHER (1) arbeitete über die Bedeutung der mineralischen Nährstoffe 30 (s. Bd. I. S. 383 u. f.) und erkannte diese Art als besonders geeignet für solche Fragen: Erforderlich erwiesen sich Kalium, Magnesium, Schwefel und Phosphor (nicht dagegen Eisen) für das Wachstum der Kulturen. Mit dessen Atmungsenzymen beschäftigte sich neuerdings KOSTYTSCHEW (1). Ueber Chemotropismus (s. Bd. I. S. 470) arbeitete MIYOSHI (1). Ver- 35 schiedene ernährungsphysiologische Fragen, ebenso die Einwirkung auf Eiweiß verfolgte BUTKEWITSCH (1), die Atmung unter verschiedenen Bedingungen DIAKONOW (1), PORODKO (1), KOSTYTSCHEW (2), MAXIMOW (1) und andere. Anscheinend ist er über die ganze Erde verbreitet; festgestellt ist u. a. sein häufiges Vorkommen unter den Luftkeimen in Japan 40 durch SAITO (5).

Die Varietät *luxurians* J. SCHROETER (2) ist offenbar ein gewöhnlicher *Rhizopus nigricans* mit blasig angeschwollenem Stolo.

Anschließend erwähnt sei hier der kürzlich von NAMYSLOWSKI (1) beschriebene *Rhizopus nodosus* (auf Brot vorkommend), weil derselbe gleich- 45 falls Zygosporen bildet, aber durch abweichend gezeichnetes Exospor seiner kleineren Sporen (6—9 μ zu 4—6 μ), den Besitz von Chlamydosporen und anderes von *Rh. nigricans* merklich verschieden war.

Rhizopus Artocarpi RACIBORSKI (1) ist bislang die einzige als unbedingt pflanzenpathogen angegebene *Rhizopus* Species; nach dem Autor 50 befällt sie lebende Blütenstände von *Artocarpus incisa* auf Java, dieselben völlig vernichtend. Die schwarzen kugligen Sporangien messen

170—190 μ, die gleichfalls dunkeln Sporen meist 12—16 μ (Grenzen 4—30 μ), sie sind rundlich eiförmig, unregelmäßig eckig, warzig. Diese Art bildet gleichfalls Zygosporen, welche kuglig braun und warzig sind und 105—120 μ Durchmesser haben. Besondere Impfversuche sind anscheinend noch nicht angestellt.

Rhizopus Oryzae Went et Prinsen Geerligs (1) ist dem *Rh. nigricans* außerordentlich ähnlich. Er ist von den genannten Forschern aus javanischen Reismehlkuchen (Ragi) isoliert worden und wirkt bei der Arrakdarstellung zumal aus Reis, doch auch aus Melasse, mit (s. 13. Kap. d. V. Bds.). Neben der verzuckernden (diastatischen) Wirkung nutzt man auf Java bei der Darstellung des „Bonkrek" — eines aus Preßrückständen der Erdnußölbereitung gewonnenen Nahrungsmittels — auch die das Eiweiß aufschließende Wirkung aus, bei der des „Tempeh" — durch direkte Verpilzung der Sojabohne bereitetes Nahrungsmittel — überdies die die Zellenwand lösende Wirkung des Pilzes; vergl. Prinsen Geerligs (1). Weitgehende Uebereinstimmung herrscht bezüglich der Sporangien, Ausläufer und Sporen mit der vorigen Art, so daß die Unterscheidung schwer ist; vergl. Wehmer (3), doch glaubt Vuillemin (4) feine Unterschiede bezüglich der Sporen und der Wärmeansprüche gefunden zu haben. Die Hauptmasse des Pilzes tritt auch hier als anfangs schneeweißes Luftmycel (Stolonen bezw. Sporangienträger) auf, später nimmt alles braune bis braunschwarze Farbe an. Die Wand jüngerer doch schon reifer Sporangien ist, wie bei anderen *Rhizopus*- und *Mucor*-Arten, meist zerfließlich, erhärtet also erst später; nicht selten bricht sie dann als Ganzes mit der zusammenklebenden Sporenmasse von der gewölbten Columella ab (s. *Fig. 119*). Der Sporangiendurchmesser schwankt selbst in derselben Kultur zwischen 50 und 200 μ. Die Sporen (kuglig-länglich bis unregelmäßig) messen gewöhnlich 6—8 μ (Extreme 3,5—10 μ); derbwandig und eckig findet man sie erst in alten Köpfchen. Zygosporen sind bislang nicht gefunden worden. Chla-



Fig. 119. Rhizopus Oryzae Went et Prinsen Geerligs. *1*: Sporangienträger neben Rhizoiden, *2* u. *3*: desgleichen ohne Rhizoiden aus der Spitze des „Stolo" entspringend, *4*: Sporangium, die Sporenmasse samt Wand unter dem Deckglas als Ganzes sich ablösend. *5*: Columella, *6*: Sporen, schwach vergrößert, *7*: eine Spore stark vergrößert, *8*, *9*, *11*: Gemmen, *10*: Kugelzellen, zum Teil mit Keimschlauch (*ks*) auswachsend. — Ungefähre Vergr. von *1* u. *2*: 3, von *3*, *4*, *5*: 30, von *6*: 300, von *7*: 800, von *8*—*11*: 300. *1*, *2*, *4*, *5*, *6*, *10* nach Wehmer, *3*, *8*, *9*, *11* nach Went und Prinsen Geerligs, *7* nach Vuillemin.

mydosporen. Gemmen finden sich jedoch einzeln wie reihenweise nebeneinander in den älteren Hyphen vor. Auch Kugelzellen kommen vor, ohne jedoch besondere Größe zu erreichen; sie keimen gewöhnlich mit Keimschlauch aus. Der Pilz wächst zumal bei 30—40° ungemein rasch, verzuckert Stärke lebhaft, bildet auch etwas Alkohol, ohne gerade sehr auffällige Gärungserscheinungen zu erregen. Gelegentlich bleiben die Rasen steril oder erzeugen nur sparsam Sporangien. Abnormitäten (Fehlschlagen und Durchwachsen des Sporangiums, blasenförmige Stolo-Anschwellung u. a.) kommen gleichfalls vor. Genaueres über diese als erste bekannt gewordene gewerblich wichtige *Rhizopus*-Art teilten WENT und PRINSEN GEERLIGS (1) im Jahre 1895 mit; später wurde sie auch durch WEHMER (3) und besonders VUILLEMIN (4) kultiviert und näher beschrieben.

Chlamydomucor Oryzae WENT et PRINSEN GEERLIGS (1) dürfte als eine sterile Form des *Rh. Oryzae* anzusehen sein, welche die gleichen aber dauernd schneeigen Luftmycelien, bislang jedoch keine Sporangien, bildet. Von ihr kennt man nur Gemmen (Chlamydosporen), die in festen Substraten zu außerordentlich großen, dickwandigen, kugligen oder länglichen Gebilden heranwachsen (s. *Fig. 120*). Bei einer Wandstärke von 17 μ trifft man solche von bis 130 μ Durchmesser. Von sterilem *Mucor Rouxii* ist dieser Pilz schon durch seine vorzugsweise Entwicklung oberhalb des Substrats verschieden, ebensowenig bildet er auf gedämpftem Reis jenen orangegelben Farbstoff, ganz abgesehen davon, daß jener *Mucor* unschwer zur Sporangienbildung zu bringen ist. Im javanischen Ragi spielt er eine Rolle als Verzuckerungspilz und wurde nach dieser Richtung von WENT und PRINSEN GEERLIGS näher studiert; man vergleiche auch WEHMER (3).



Fig. 120. *Chlamydomucor Oryzae* WENT et PRINSEN GEERLIGS.
12: Luftmycel steril bleibende Sporangienträger bezw. Ausläufer, *13–15*: Gemmen (Chlamydosporen) mit sehr derber Wand, im opt. Durchschnitt. — Vergr. von *12*: ca. 50, von *13—15*: ca. 100. Nach WEHMER.

Rhizopus japonicus VUILLEMIN ist diejenige der verzuckernden Pilzspecies, welche das Interesse der europäischen Brennereitechniker vorwiegend erregt und bis heute wach erhalten hat (s. 13. Kap. d. V. Bds.); in Belgien, Frankreich, Ungarn wird er bei Verarbeitung von Mais auf Alkohol verwendet. Als *Amylomyces β* ist er bereits im Jahre 1900 von BOIDIN (1) aus japanischem Koji (s. S. 246) isoliert und bekannt geworden; man vergleiche auch COLLETTE und BOIDIN (1), sowie FERNBACH (1). Unter P. LINDNER's Leitung ist er dann von SITNIKOFF und ROMMEL (1) und schließlich von HENNEBERG (1) mit Rücksicht auf praktische Fragen untersucht, aber erst im Jahre 1902 von VUILLEMIN (4) als *Rhizopus*-Species erkannt und genauer beschrieben worden. Mit seiner Ernährung durch verschiedene Kohlenhydrate haben sich HENNEBERG sowie SITNIKOFF und ROMMEL, später auch NIKOLSKY (1) beschäftigt. Eine Uebersicht

chemisch-physiologischer Daten im Vergleich zu anderen Pilzen (Hefen) findet man bei P. LINDNER (1). Morphologisch (s. *Fig. 121*) steht diese Art den übrigen der Gattung so nahe, daß sie nur schwer abzugrenzen ist. Es wiederholen sich dieselben allgemeinen Bauverhältnisse, 5 wie wir sie bei *Rh. nigricans* und *Rh. Oryzae* kennen lernten: Ausläufer, Sporangienträger, Sporangium, 10 Columella, Apophyse und Sporen zeigen nach Art, Farbe, Form und Größe so geringe oder selbst ganz ver- 15 schwindende Differenzen, daß eine sichere Unterscheidung kaum, jedenfalls aber nur mit Mühe, möglich 20 ist. Man sehe dazu die Ausführungen bei VUILLEMIN ein, der den Pilz mit *Rh. nigricans*, *Rh. Oryzae* und 25 *Rh. tonkinensis* verglich, sowie bei SITNIKOFF und ROMMEL, die Unterschiede gegen die letztgenannte Art aufsuchten. Gleichwie bei den anderen *Rhizopus*-Arten sind die Rasen von grauer bis schwarzbrauner 30 Farbe, ca. 1—2 cm hoch. Sie zeigen mehr oder minder dicht die kleinen schwarzen Sporangien, welche ca. 160—215 μ im Durchmesser halten und zu 3 bis 6 auf ca. 1 mm hohen Stielen entweder neben Rhizoiden aus den Anheftungspunkten der sich über das Substrat erhebenden fertilen Hyphe (Stolo, Sporangienstandsachse VUILLEMIN's) oder aus deren frei 35 in den Luftraum ragenden Spitze entspringen. Wo im letzteren Falle diese Hyphe keulige bis kuglige Anschwellung zeigt, kommen jene eigenartigen Bilder zustande, wie sie früher von SITNIKOFF und ROMMEL für die Sporangienträger gegeben wurden; das sind natürlich in das Gebiet des Abnormen gehörige Bildungen, die übrigens für andere Species ab 40 und zu schon früher beobachtet, aber erst durch VUILLEMIN richtig gedeutet wurden. So findet man beispielsweise bereits im Jahre 1886 bei ADAMETZ (1) solche eigentümlich angeschwollene Sporangienträger eines ihm rätselhaft erscheinenden *Mucor* (a. a. O., Taf. I, Fig. 1), der hiernach offenbar ein *Rhizopus* ist. Als Sporangiumdurchmesser gaben SITNIKOFF 45 und ROMMEL übrigens kaum die Hälfte der obigen von VUILLEMIN gemessenen Zahl an (45—95 μ im Durchm.); die Sporengröße maßen dieselben durchschnittlich zu 9,1 μ Länge bei 5,7 μ Dicke (trockene Sporen) bezw. zu 9,6 μ zu 8,1 μ (nach halbstündigem Quellen) und stellten auch fest, daß die feinen Linien ihrer Oberfläche zarten Falten des 50 Exospors entsprechen. VUILLEMIN gibt als mittlere Sporengröße 9 μ zu 6,5 μ an (Schwankungen von 7 μ zu 5,65 μ bis 12,5 μ zu 9 μ) und als Gestalt haselnußähnlich mit leicht eckigen Konturen; bei diesem findet man auch eine genaue Beschreibung der mannigfachen Formen des



Fig. 121. *Rhizopus japonicus* VUILLEMIN = *Amylomyces β*). *10*: Sporangienträger und Rhizoiden aus der Anheftungsstelle des schwach anschwellenden Stolo (*b*), *11*: senkrecht emporgewachsener Stolo, ohne Rhizoidenentwicklung direkt zum Sporangienträger werdend, *12*: Spore, stark vergrößert. *13*: Gemmen (Chlamydosporen). — Ungefähre Vergr. von *10* u. *11*: 80, von *12*: 2000, von *13*: 120. *10* u. *12* nach VUILLEMIN, *11* u. *13* nach SITNIKOFF und ROMMEL.

Sporangienträgers. Das Endospor ist relativ derb; die feinen, von einem bestimmten Punkte ausstrahlenden Falten des umgebenden Exospors sind nach demselben schon an sehr jungen Exemplaren vor der Reife des Sporangiums wahrnehmbar. Die große glatte hellbraune Columella sitzt einer ebensolchen Apophyse auf, bietet sonst aber nichts der Art Eigentümliches. Auf den üblichen Substraten (Würze, Reis, Kartoffeln u. a.) ist sie leicht kultivierbar, erzeugt auch reichlich Gemmen (Chlamydosporen); Kugelzellen sind bislang nicht beobachtet worden. Ihr Optimum liegt über 30 °, nach Sitnikoff und Rommel bei 36—38 ° (für Würze), das Maximum oberhalb 40 °. Gegenüber dem *Rh. tonkinensis* vergärt sie nach Sitnikoff und Rommel auch Rohrzucker, Raffinose, Inulin und Melibiose, dagegen nicht Trehalose. An Alkohol fand Henneberg (1) bis gegen 5 Proz., unter minder zusagenden Bedingungen aber weit weniger. Dieser Forscher stellte auch eine Reihe von Versuchen über die Brauchbarkeit des Pilzes zur Verzuckerung von Kartoffelmaischen an, welche aber ein unbefriedigendes Resultat ergaben, indem die Art in derartigen bei 3 Atmosphären sterilisierten Maischen infolge Bildung schädlicher (sauerer) Stoffe schlecht wächst, bei ungenügender Sterilisation andrerseits gegen Bakterieninfektion sehr empfindlich ist. Milchsäure (0.5 Proz.) sowie Schwefelsäure (0,05 Proz.) verzögerten das Wachstum merklich. In Maismaischen wächst sie dagegen gut. Ihre Verwendung in der Kartoffelbrennerei kommt zur Zeit also nicht in Frage.

Rhizopus japonicus Vuillemin *var. angulosporus* nannte Saito (6) im Jahre 1906 einen *Rhizopus*, dessen Keime oft reichlich in dem für die Soya-Darstellung bereiteten Koji sowie auch in der Soyamaische (s. S. 263) vorhanden sind, und der sich von *Rh. japonicus* nach Saito durch eckig-ovale Sporen und deutliche Streifung der Sporenwand unterschied. Trotz seines kräftigen Reisverzuckerungsvermögens ist sein Auftreten in der Praxis unerwünscht, weil er den Präparaten (Koji) eine störende dunkle Farbe gibt; in gutem Koji darf er nicht vorhanden sein. Auch hier finden sich die eigentümlichen blasigen Anschwellungen der Sporangienträger, die im übrigen denen der anderen Arten entsprechen. Die Sporen messen 12—18 μ in der Länge bei 8 μ Dicke. Die lockeren Rasen sind von braunschwarzer Farbe. Gemmen waren nicht zahlreich, Zygosporen und Kugelzellen wurden nicht beobachtet. Auf Reis, Würze, Kojidekokt wächst er gut, kommt jedoch in salzhaltigem Kojidekokt nicht zur Entwicklung. Der Sporangiendurchmesser beträgt 44—88 μ, die Columella mißt 20—56 μ. Als Varietät des *Rh. japonicus* erscheint der Pilz zumal auf Grund der sehr großen Sporen wohl zweifelhaft, vielleicht wäre er zu *Rh. Oryzae* zu ziehen. Uebrigens besitzt auch *Rh. japonicus* Vuillemin feingestreifte Sporen (faltiges Epispor); dieser Unterschied — der bei wirklichem Vorhandensein überhaupt als Speciesunterschied einzuschätzen wäre — fiele also fort.

Rhizopus tonkinensis Vuillemin ist der früher als *Amylomyces γ* (gegenüber *Amylomyces α* = *Mucor Rouxii* und dem zuvor genannten *Amylomyces β*) benannte, von Boidin (1) aus Reismehlkuchen (levure chinoise) von Tonkin isolierte und durch Vuillemin (4) im Jahre 1902 als *Rhizopus*-Art erkannte weitere Verzuckerungspilz genannt worden. Morphologisch wie kulturell stimmt er so gut wie ganz mit dem *Rh. japonicus* überein, doch vermag er nach Sitnikoff und Rommel (1) Rohrzucker, Melibiose, Raffinose und Inulin nicht zu vergären, dagegen aber Trehalose; s. auch P. Lindner (1). Vuillemin

glaubt ihn durch einige feinere Unterschiede (etwas kleinere Sporangien und Sporen) von jenem unterscheiden zu können. Die Wachstumstemperaturen sind ungefähr die gleichen. Optimum ca. 36—38° (nach SITNIKOFF und ROMMEL) bei Kultur in Würze. Gerade wie bei jenem entwickelt sich also die aus dem Substrat hinaustretende Hyphe direkt zu einem verzweigten Sporangienträger (s. *Fig. 122*), oder sie erzeugt neben sporangientragenden Stielen (Sporangienträger der früheren Literatur schlechthin) gleichzeitig Hafthyphen (Rhizoiden), wobei im übrigen wie bei *Rh. japonicus* wieder mancherlei Abweichungen und Mißbildungen vorkommen können; man vergleiche darüber Genaueres bei VUILLEMIN (4). Den mittleren Durchmesser der Sporangien („Sporocysten“) gibt dieser Forscher zu 75—100 μ an; häufig sind kleinere, seltener größere Exemplare. SITNIKOFF und ROMMEL (1) maßen als Grenzwerte nur 45 bis 95 μ. Columella und Apophyse sind nicht merklich von denen anderer *Rhizopus*-Arten verschieden. Die Sporen haben im Mittel 8 μ an Länge bei 5,65—6,5 μ Dicke frisch (nach VUILLEMIN), trocken 7,2 μ zu 4,3 μ (nach SITNIKOFF und ROMMEL). Eigenes Kulturmaterial zeigte durchschnittlich 9,6 μ zu 6 μ, bei einer Längenschwankung von 6—12 μ (in Wasser gemessene reife Sporen). Kleine Größenunterschiede zwischen den Arten wird man also wohl nur mit Vorsicht zur Unterscheidung heranziehen können. Auch hier findet man die feinen von einem bestimmten Punkt ausgehenden Falten des Exospors. Die Gemmen sind wie bei *Rh. japonicus*. Kugelzellen sind bislang nicht beobachtet worden. Vergleichende Kulturen

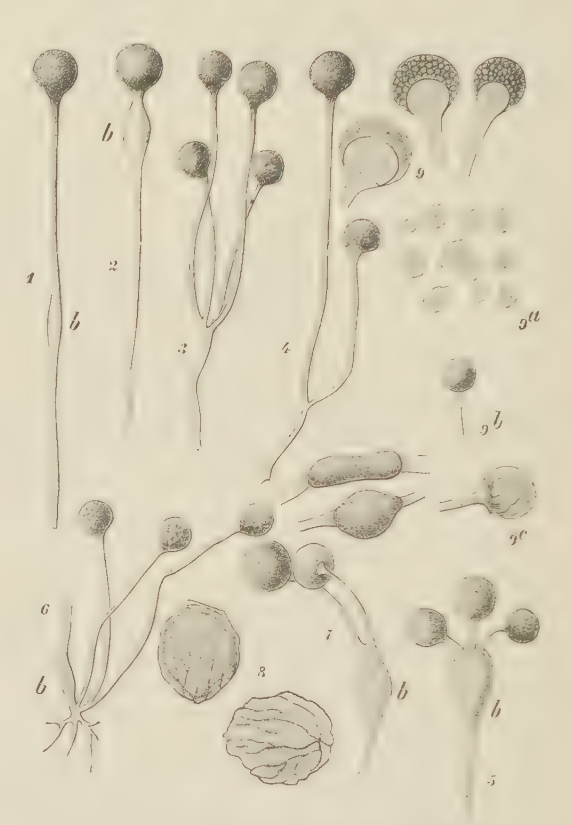


Fig. 122. Rhizopus tonkinensis VUILLEMIN (= *Amylomyces γ*).
1—7: Sporangienträger verschiedener Gestalt, teils direkt aus dem Stolo hervorgehend, teils (*6*) seiner Anheftungsstelle neben Rhizoiden entspringend, in *1, 5, 7* mit der eigenartigen bauchigen Anschwellung (*b*), die auch in *6* bei *b* angedeutet ist (s. d. Text). *8* u. *9a*: Sporen, davon *8* stark vergrößert mit dem charakteristischen faltigen Epispor. *9b*: Gemmen, *9* u. *9c*: kleinere Sporangien und Columella, erstere im opt. Durchschnitt. — Ungefähre Vergr. von *1—7*: 50, von *8*: 1500, von *9*: 150, von *9a*: 400, von *9b*: 220, von *9c*: 100. — *7* nach SITNIKOFF und ROMMEL, *9—9c* Original, das Uebrige nach VUILLEMIN, verkleinert.

dieser Art mit *Rh. Oryzae*, *Rh. japonicus* und *Rh. nigricans* auf RAULINscher Nährlösung und Kartoffeln sind von VUILLEMIN (4) genauer beschrieben worden, am meisten wich hier die letztgenannte Art ab. Einzelne der unterscheidenden Punkte seien in der nachfolgenden Tabelle kurz zusammengestellt: es wäre von Interesse, noch näher zu zeigen, ob 5 daraufhin eine sichere Identifizierung praktisch möglich ist.

	Rh. nigricans	*Rh. Oryzae*	*Rh. tonkinensis* (γ)	*Rh. japonicus* (β)
Auf Kartoffel bei 39° kultiviert	nach 4 Tagen tot	kräftigste Entwicklung bei 37—39°	etwas schwächere Entwicklung als bei *Rh. Oryzae*, aber gutes Wachstum	
In RAULIN'scher Nährlösung bei 37° kultiviert	keine Entwicklung (schon bei 30° langsam)	erst submerse, dann zarte Luftmycel-Entwicklung in 5 Tagen	—	keine sichtbare Entwicklung
Sporengröße	12 μ zu 8 μ im Mittel (Extreme 9 μ zu 7,5 μ bis 15 μ zu 11 μ)	6—8 μ lang im Mittel (hier Messung eigenen Materials. Extreme 3,5—10 μ)	8 μ zu 5,6—6,5 μ im Mittel	9 μ zu 6,5 μ im Mittel (Extreme 7 μ zu 5,6 μ bis 12 μ zu 9 μ).

SITNIKOFF und ROMMEL (1), die sich zuerst bemühten, Unterschiede zwischen diesen einander so ähnlichen, von ihnen vergleichend kultivierten Pilzarten zu ermitteln, fanden folgende Zahlen:

	Rh. japonicus	*Rh. tonkinensis*
durchschnittliche Größe der Sporen (trocken gemessen)	9,1 μ zu 5,7 μ	7,2 μ zu 4,3 μ
" " " " (eine halbe Stunde in Würze gelegen)	9,6 μ " 8,1 μ	8 μ " 6,8 μ
Hyphendicke in Rohrzucker-Nährlösung	13,8 μ	8,3 μ
Junge Keimschläuche, Dicke	5 μ	4,2 μ

Die Verfasser bezweifeln mit Recht, daß solch geringe Unterschiede für 10 die mikroskopische Analyse verwertbar sind; sie wären es vielleicht eher, wenn nicht so beträchtliche Schwankungen zumal auch bei den Dimensionen der Sporen vorkämen. Besonderen Wert muß die weitere Forschung offenbar auf die genaue Durcharbeitung der physiologischen Eigentümlichkeiten legen. Inwieweit *Rh. tonkinensis*, dessen diastatisches 15 Vermögen nicht geringer als das des *Rh. japonicus* sein soll, in Europa technisch zu verwerten gesucht wurde, darüber ist nichts bekannt geworden.

Die weiterhin in den letzten Jahren aufgestellten vier neuen Species aus chinesischen Mehlkuchen sind mit den genannten nicht vergleichend 20 untersucht, sondern einfach beschrieben worden. Endgültiges läßt sich über sie also nicht sagen, jedenfalls gleichen sie den besprochenen außerordentlich. Für die Unterscheidung kämen zumal Aussehen und Größe der Sporen, Wärmeansprüche und chemische Wirkungen (gegen Zuckerarten, Gelatine u. a.) in Frage, alles andere wiederholt 25 sich in üblicher Weise mit den für alle diese Species bekannten starken Schwankungen. Wohl nur ein *Rh. Oryzae* ist der

Rhizopus Cambodja (CHRZASZCZ) VUILLEMIN, aus Mehlkuchen von Cambodja irrtümlich zunächst durch CHRZASZCZ (1) im Jahre 1901 als *Mucor* beschrieben, trägt jedoch die offenkundigen Merkmale eines echten 30 *Rhizopus* (Ausläufer, Rhizoiden, aufsitzende Columella), was übrigens schon

von LAFAR (1) im Jahre 1901 angedeutet und durch VUILLEMIN (4) im Jahre 1902 richtig gestellt worden ist. Die Species nimmt auch keineswegs, wie der erste Untersucher glaubte, eine Mittelstellung zwischen *Mucor* und *Rhizopus* ein, sie ist vielmehr eine zweifelhafte; das ihr zu-
5 geschriebene besondere Merkmal, darin bestehend daß Sporangienträger mehrfach nicht büschelweis oberhalb, sondern nur in Nähe der Rhizoiden, außerhalb der Knoten entstehen, findet sich, wie schon VUILLEMIN (4) bemerkt, auch bei anderen Arten, so z. B. gerade so bei *Rh. Oryzae*, *Rh. chinensis*. Die Idee bei Aufstellung der Species entspringt
10 somit einem Mißverständnis. Unterscheidende Merkmale gegenüber den bisherigen vier Arten sind in der Diagnose nicht angeführt, dagegen finden sich dieselben Mißbildungen (blasige Anschwellung des Stolo u. a.), so daß die Species vor der Hand nur als Synonym gelten kann und wahrscheinlich zu *Rh. Oryzae* WENT et PRINSEN GEERLIGS zu ziehen
15 ist. Als Maße sind angegeben worden: Sporangien 47—109 μ, Columella 25,7—44,2 μ breit, 22,4—44,2 μ hoch, Sporen 4,2—7,4 μ lang, 3,7—5,2 μ breit, Sporangienträger 78 μ bis 1 mm hoch. Die Sporen dickwandig, glatt (?), rundlich-länglich bis eckig. Rasen bis 1—2 cm hoch. Keine Zygosporen, doch Gemmen. Gelatineverflüssigung sehr träge (15°),
20 mit schwachem Gärvermögen, Wachstumsoptimum 35—40°. Minimum etwas über 10°. Schwach säuernd, Stärke verzuckernd; schlechte Substrate waren Milchzucker und Rohrzucker. Auf Reis, Gelatine, Würze gut wachsend. Bis auf die Sporengröße, welche noch genauer zu kontrollieren wäre, ist das alles nichts Spezifisches, es paßt gerade so gut auf die
25 anderen Arten. Der morphologische Aufbau auch der folgenden drei Species zeigt allem Anschein nach dasselbe Bild.

Rhizopus chinensis SAITO wurde im Jahre 1904 in einer chinesischen Hefe (s. Bd. V, S. 320), die aber aus Weizenmehl (nicht Reismehl) hergestellt wird, von SAITO (1) aufgefunden und näher beschrieben. Seine
30 grauschwarzen Rasen werden 2—3 cm hoch, die glatten Sporangien haben meist ca. 70 μ (50—80 μ) im Durchmesser. Die Columella, oft mit kleinem Basalkragen, bald flach, bald mehr gewölbt, hat 30—37 μ im Durchmesser oder 20—55 μ Höhe bei 23—40 μ Breite. Die Sporen sind kuglig-oval, ziemlich gleich groß, dünn- und glattwandig, sie
35 messen 5—7 μ (im Durchm.) oder 10 μ zu 8 μ und erscheinen hiernach von denen der drei vorhergehenden Species (*Rh. Oryzae*, *Rh. tonkinensis*, *Rh. japonicus*) abweichend; Glattwandigkeit (sofern starke mikroskopische Vergrößerung nicht ein anderes konstatierte) würde sie überhaupt von denen der übrigen *Rhizopus*-Arten trennen. Zygosporen sind nicht
40 beobachtet worden, dagegen kommen Gemmen wie Kugelzellen vor. Die Art wächst gut auf Reis, minder gut auf Gelatine, am schlechtesten auf Agar, wie letzteres Substrat ja überhaupt für fast sämtliche Mucorineen wenig günstig ist und gern steril bleibende Vegetationen ergibt. Ein gutes Kultursubstrat ist auch hier Würze, minder gut sind Zuckerarten
45 mit Mineralsalzen (Dextrose, Maltose, Galactose, schlecht sind Lactose und Inulin). Stärke wird verzuckert, der Zucker auf Alkohol vergoren. Die Gelatineverflüssigung bei mittlerer Temperatur ist sehr träge (erst nach Wochen zu konstatieren). Aehnlich wie *Mucor Rouxii*, *M. piriformis* und andere Arten zeigen ältere Kulturen deutlichen
50 Estergeruch. Das Wachstumsoptimum liegt zwischen 30 und 40° C.

Rhizopus Tritici SAITO, aus dem gleichen Material wie vorige Art im Jahre 1904 durch SAITO (2) isoliert, bildet 2—5 cm hohe Rasen von schließlich schwarzer Farbe. Die Sporangien haben 85—210 μ im

Durchmesser; ihre ältere Wand ist mit feineren oder groben Kristallnadeln bedeckt und hinterläßt oft deutlichen Kragenrest. Die Sporen haben 5—6 μ im Durchmesser, sind von ziemlich gleicher Größe, kuglig-oval, derbwandig und fein gestreift; in älteren Kulturen finden sich auch größere, teils eckige Formen, zum Teil verwachsen. Es finden sich Chlamydosporen, doch fehlen bislang Zygosporen und auch Kugelzellen. Auch für diese Art ist Milchzucker und Inulin ein schlechter Nährstoff. Kräftiges Wachstum findet auf Reis, Gelatine, Würze statt. Das Optimum liegt bei 30—35° C, bei 40° ist das Wachstum nur noch träge. Das Gelatineverflüssigungsvermögen schien hier stärker zu sein als bei der vorigen Species. Stärke wird verzuckert. Merkliche Gärungserscheinungen wurden nur in Würze beobachtet; dabei findet Ansäuerung wie bei manchen anderen dieser Species statt, die fixe Säure entsprach ca. 42 ccm Zehntelnormallauge auf 100 ccm.

Rhizopus oligosporus Saito wurde im Jahre 1905 aus Reismehlkuchen von Saito (3) neben *Rh. chinensis* isoliert. Sporangienbildung war bei ihr selten. Die Stiele maßen 0,6—1,1 mm bei 10—18 μ Dicke. Die Wand der Stiele ist später tief gelbbraun, bisweilen durch Oxalatkristalle rauh. Die schwarzen Sporangien entstehen nie auf Gelatine oder Agar; sie maßen gewöhnlich 180 μ im Durchmesser (bis 100 μ abwärts); ihre Membran ist warzig, wie bei allen Species hart und brüchig, oft hinterläßt sie große Fetzen als Basalkragen. Die Columella ist gewölbt oder flach, meist ziemlich breit der Apophyse aufsitzend, bei 120 μ Breite und 100—120 μ Höhe, nicht selten auf die Hälfte (60 μ) herabgehend. Die Sporen sind kuglig-oval, haben 7—10 μ im Durchmesser, sind dünn- und glattwandig, bisweilen zu unregelmäßigen Formen verwachsend. Reichlich werden Gemmen gebildet, Zygosporen sind nicht beobachtet. Reis ist das günstigste Substrat, auch Würze eignet sich; bei Verwendung von Zuckerarten (Dextrose, Lävulose, Maltose, Galactose) mit Mineralsalzen entstehen trotz guten Wachstums gewöhnlich keine Sporangien. Minder günstig sind Rohrzucker, Milchzucker, Inulin. Das Wachstumsoptimum liegt bei ca. 30—35°, bei Zimmertemperatur wächst er nur langsam. Stärke wird verzuckert, auch findet schwache Gärung statt. Ob die Art scharf von den vorher beschriebenen zumal auch *Rh. Oryzae* abzugrenzen ist, bleibe dahingestellt, auch letzterer neigt zum Sterilbleiben. Saito selbst weist auf die Beziehung zu *Chlamydomucor Oryzae* Went et Prinsen Geerligs hin, der, wie schon auf S. 495 bemerkt wurde, wohl nur eine sporenlose Form des *Rh. Oryzae* ist.

Rhizopus Tamari Saito (6) bildet nach einer kurzen Mitteilung des Autors aus dem Jahre 1906 den Hauptbestandteil der Flora eines aus Sojabohnen bereiteten Kojis, das bei der Tamari-Darstellung Verwendung findet. Tamari ist eine in bestimmten Gegenden Japans hergestellte soyaähnliche salzreiche Würze, die durch einen 12 Monate dauernden Reifungsprozeß aus dem mit Salzwasser übergossenen Koji gewonnen wird. Der *Rhizopus* scheint hier die Rolle des *Aspergillus Oryzae* zu spielen. Nach Saito's Angabe unterscheidet er sich von dem sonst ganz ähnlichen *Rh. japonicus var. angulosporus* dadurch, daß er Inulin und Melibiose nicht vergären kann. Seine Sporen messen 6—12 μ zu 4—8 μ oder 6—8 μ (kuglige), die Sporangienträger sind 400 μ hoch, das Sporangium hat 48—144 μ im Durchmesser, die Columella ist 48—120 μ hoch und 36—112 μ breit. Beide Arten vergären Rohrzucker, aber gleich allen anderen Mucoreen nicht Milchzucker.

Nach den vom Autor mitgeteilten Messungen sind übrigens die Sporen des *Rh. Tamari* wesentlich kleiner. —

Aufgabe besonderer Institute oder Laboratorien für technische Mykologie wäre nun Sammlung und Bearbeitung dieser zahlreichen in ihren gegenseitigen Beziehungen noch ziemlich ungeklärten *Rhizopus*-Arten. Die technische Mykologie hat an diesen praktisch verwerteten Verzuckerungspilzen (s. 13. Kap. d. V. Bds.) ein weit größeres Interesse als an den alkoholbildenden Mucorien.

Die nicht technischen, älteren, durchweg als Schimmelbildung auf organischen Substanzen verschiedener Art auftretenden *Rhizopus*-Species sind bereits auf S. 490 aufgenannt worden; Näheres darüber ist bei FISCHER (1) zu finden. Unter ihnen befindet sich nur eine tierpathogene Species; das ist *Rhizopus Cohnii* (COHN) BERLESE et DE TONI, der zuerst als *Mucor rhizopodiformis* COHN von LICHTHEIM (1) im Jahre 1884 beschrieben wurde; er ist für Kaninchen — dagegen nicht für Hunde — pathogen. Die Tatsache, daß wir nunmehr eine große Anzahl von *Rhizopus*-Arten mit höher liegendem Wachstumsoptimum kennen, legt die Frage nahe, ob nicht unter diesen sich auch pathogene Arten befinden. Es wäre für die Diagnose derselben also zweckmäßig auch der Tierversuch heranzuziehen; tatsächlich könnte ja die eine oder andere dieser Species in ihrer Heimat auch krankheitserregend sein. Ueber derartige Krankheiten in Ostasien wissen wir nicht allzuviel. Gelegenheit zur Infektion ist bei der sehr allgemeinen Verbreitung dieser Formen im Reismehl, also auch an der Reispflanze selbst, jederzeit gegeben. Für Europa ist eine zweite pathogene Art kürzlich (1903) von COSTANTIN und LUCET (1) am Pferd gefunden und als *Rhizopus equinus* benannt worden; Ueberimpfen auf Kaninchen bewirkte tödliche Erkrankung unter den Erscheinungen der Eingeweidetuberkulose. Hühner waren immun. Die Art bildete leicht Zygosporen, war aber von *Rh. Cohnii* deutlich verschieden. Uebrigens scheint es nach der näheren Beschreibung nicht ganz ausgeschlossen zu sein, daß der von SIEBENMANN (1) bei einer Ohrerkrankung gefundene, von FISCHER (1) als *Mucor racemosus* FRES. gedeutete *Mucor septatus* SIEBENM. auch als ein *Rhizopus* zu betrachten ist.

§ 108. Phycomyces, Thamnidium, Sporodinia, Tieghemella.

In der Gattung *Phycomyces* sind die Sporangienträger nicht von denen bei *Mucor* verschieden, stets unverzweigt, mit metallglänzendem bronzegrünen oder violettbraunen Stiel. Das Sporangium ist mit großer nicht aufsitzender meist birnförmiger Columella und zerfließlicher, mit Kalknadeln inkrustierter Wand versehen. Die Zygosporen weichen jedoch durch die mit schwarzbraunen, dichotom verzweigten Dornen versehenen Suspensoren ab. Nur eine gutbekannte häufigere neben einer anscheinend selteneren Art ist beschrieben worden. Allein erstere, ein Riese unter den Schimmelpilzen, kommt hier in Betracht. Es ist dies

Phycomyces nitens (AGARDH) KUNZE, der als hoher Schimmelrasen gern auf ölhaltigen Substraten auftritt, so in Oelmühlen, auf Palmkuchen, Oelkuchen, auch auf Brot, Mist verschiedener Tierarten, Gerberlohe u. a., übrigens ohne weiteres an der außerordentlichen Größe (bis 30 cm) und den metallglänzenden olivfarbenen Sporangienträgern kenntlich und ein

beliebter pflanzenphysiologischer Versuchspilz der botanischen Laboratorien ist. Die aufrechten unverzweigten querwandlosen 7—30 cm hohen und 50—150 μ dicken glänzenden Sporangienträger (s. *Fig. 123*) enden in einem kugligen, 0.25—1 mm dicken, schwarzen, feinstachligen Sporangium, dessen Wand gewöhnlich ohne Hinterlassung eines Kragenrestes zerfließt und eine helle glatte breit birnförmige, seltener gewölbt-zylindrische Columella (bis 330 μ zu 180 μ groß) hinterläßt. Die Sporen sind ellipsoidisch, oft abgeflacht, glatt, 16—39 μ zu 8—15 μ groß, gelblich, in Massen orangefarben. Die Art bildet an der Substratoberfläche schwarze kuglige Zygosporen (bis 500 μ im Durchm.) mit dicker glatter oder schwach warziger dunkler Wand; ihre Suspensoren sind mit zahlreichen dunklen starren, wiederholt gablig geteilten Dornen versehen. Auch Gemmen verschiedener Gestalt sind beobachtet worden. Die Keimfähigkeit der Sporen erlischt innerhalb eines Jahres, oft schon nach wenigen Monaten. Wie bei *M. Mucedo*, *M. piriformis* u. a. kommen sehr kleine Sporangienträger von kaum 0.1 mm Länge mit 25 μ dickem Sporangium, auch abweichender Sporengestalt (kuglig, ca. 16 μ im Durchm.) vor, zumal als erste Vegetation in neuen Kulturen; erst später folgen dann die normal ausgebildeten. Auch Träger mit kleinen Seitensporangien findet man gelegentlich. Weitere Angaben sehe man bei A. Fischer (1). Anscheinend wird das natürliche Vorkommen des Pilzes heute seltener, wohl aus einem ähnlichen Grunde, wie er das Zurückdrängen von *Leuconostoc* aus den Zuckerfabriken, das Seltenerwerden von blauer Milch, blutigem Brote im Haushalte, von Baumschwämmen im Walde und von Saprophyten und Parasiten überhaupt in der näheren Umgebung des Menschen zur Folge hat.

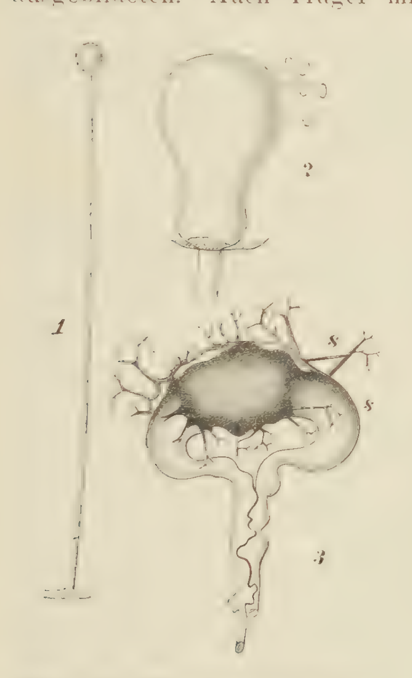


Fig. 123. *Phycomyces nitens* (Ag.) Kunze.
1: Sporangienträger, *2*: Columella mit Sporen, *3*: Zygospore mit dornigen Suspensoren. — Vergr. von *1*: ca. 50, von *2*: ca. 85, von *3*: ca. 50. — *1*: Origin., *2* nach A. Fischer, *3* nach van Tieghem und le Monnier.

Mucoraceen aus anderen Gattungen der Familie treten nur ausnahmsweise dem Techniker vor Augen, entbehren auch besonderer Bedeutung. Am häufigsten findet man auf organischen Substanzen noch hellfarbene bis bräunliche Schimmelrasen zweier Pilze aus den Gattungen *Thamnidium* und *Sporodinia*, die hier deshalb kurz erwähnt werden mögen.

Thamnidium elegans Link (= *Mucor elegans* Fries der früheren Autoren) bildet auf gekochten Vegetabilien, Brot, Zuckerlösungen, Fruchtsäften, Kleister, Mist verschiedener Tiere helle zarte, ganz mucorähnliche Rasen, deren Sporangienträger jedoch neben dem Hauptsporangium zahlreiche kleinere an gabelig verzweigten Seitenästen ausbilden (s. Bd. I, S. 188, Fig. 44). Wenn letztere, wie das bisweilen vorkommt, fehlen, kann der Pilz, der leicht auf den üblichen Substraten in Reinkultur zu züchten

ist, nicht von *Mucor* unterschieden werden. Genauere Beschreibung findet man bei FISCHER (1).

Sporodinia grandis LINK tritt fast regelmäßig auf Hutschwämmen in Wäldern als centimeterhoher hellbrauner lockerer Filz auf, der aus den miteinander verschlungenen reich verzweigten Sporangien- und Zygosporen-Trägern besteht (s. *1* in Fig. 104 auf S. 457) und jederzeit Massen von Zygosporen enthält. Von keiner anderen Mucorinee kann man sich solche so leicht verschaffen. Diese Art ist gleichfalls leicht in Kultur zu ziehen und vielfach untersucht worden. Man vergleiche auch Bd. I, S. 200, Fig. 52.

Tieghemella japonica nannte SAITO (4) eine unter den Luftkeimen eines Saké-Gärkellers gefundene und kultivierte, lockere graue Rasen bildende Art, die wie andere *Absidia-* und *Tieghemella*-Arten auf Grund ihrer Stolonen Vegetationen bildet, welche ganz ähnlich denen eines *Rhizopus* sind; Verwechslungen sind aber nur bei oberflächlicher Betrachtung möglich, denn unter anderen entstehen die Sporangienträger hier im mittleren Verlauf der Internodien, nicht an oder in der Nähe der Anheftungsstelle des Stolo. Die Keime einer zweiten *Tieghemella*-Art (*Tieghemella hyalospora* SAITO) finden sich häufig im Koji sowie in der Maische bei der Soyabereitung, wo sie nach SAITO (6), der die Art im Jahre 1906 beschrieben hat, störend wirken kann, da dieser Pilz zusammen mit *Rhizopus*-Arten den *Aspergillus Oryzae* zuweilen ganz verdrängt; guter Koji darf ihn also nicht oder nur spärlich enthalten.

Literatur

zum Kapitel Morphologie und Systematik der Mucoraceen.

*__Adametz,__ L., (1) Die niederen Pilze der Ackerkrume. Dissert., Leipzig 1886. *__Bail,__ Theodor, (1) Kunst- und Gewerbeblatt d. polytechn. Vereins f. Bayern, 1857, S. 11. *__Bainier,__ (1) Bulletin Soc. Mycol. de France, 1903, Bd. 19, S. 153. — (2) Ebenda, S. 106. — (3) Ann. des Sciences nat., Bot., 1883, 6. sér., Bd. 15, S. 342. — (4) Thèse de l'Ecole de Pharm, Paris 1882. — (5) Ann. des Sciences nat., Bot., 1884, 6. sér., Bd. 19, S. 206. — (6) Bulletin Soc. botan., 1889, Bd. 36, S. 184. — (7) Ann. des Sciences nat., Bot., 1883, 6. sér., Bd. 15, S. 71 u. 347; Bd. 19, S. 203. *__Barthelat,__ (1) Les Mucorinées pathogènes et les mucormycoses chez l'homme et chez les animaux. Thèse. Paris 1903. *__Bary, A. de,__ (1) Ueber Schimmel u. Hefe. Berlin 1869 (Heft 87 u. 88 der Sammlung wissenschaftl. Vorträge von Virchow u. Holtzendorff. — (2) In: A. de Bary und Woronin, Beiträge z. Morphologie u. Physiologie der Pilze. 2. Reihe. Frankfurt 1868, S. 13 u. f. — (3) Vergleichende Morphologie u. Biologie der Pilze. Leipzig 1884. *__Beauverie,__ (1) Lyon médicale, 1903, 26. April u. 6. Sept. *__Behrens,__ J., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 267. — (2) Ebenda, 1898, Bd. 4, S. 514. — (3) Landw. Versuchsstationen, 1895, Bd. 46, S. 163. *__Bessey,__ (1) Transactions of Amer. Microsc. Soc., 1903, Bd. 24, S. 27. *__Blakeslee,__ (1) Proc. Amer. Acad. of Arts and Sciences, 1904, Bd. 40, Nr. 4, S. 205; Botanical Gazette, 1906, Bd. 42, S. 161, und Science, N. S., 1904, Bd. 19, S. 864. — (2) Annales Mycologici, 1906, Bd. 4, S. 1. — (3) Science, N. S., 1906, Bd. 24, S. 118. *__Bodin,__ E., (1) Les champignons parasites de l'Homme. Paris 1902. *__Boidin,__ (1) Cit. n. Boullanger (1). *__Boidin__ und __Rolants,__ (1) La Bière, 1897, Bd. 5, S. 33. *__Bollinger,__ (1) Vorträge über Infektionskrankheiten. 1881, S. 63. *__Bonorden,__ (1) Abhandl. Naturf. Gesellsch. Halle, 1864, Bd. 8, S. 109. *__Boullanger,__ E., (1) Revue génér. des sciences pures et appl., 1901, S. 689. *__Brefeld,__ O., (1) Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie. 1. Heft, Schimmelpilze (Mucor mucedo), 1872. — (2) Flora, 1873, Bd. 56, S. 385. — (3) Landw. Jahrbücher, 1876, Bd. 5, S. 281. — (4) Bot. Ztg., 1875, Bd. 33, S. 834. — (5) Botan. Untersuchungen über Schimmelpilze, 1881, Heft 4, S. 1 u. f. — (6) Jahresber. d. Schles. Ges. f. vaterl. Kultur, 1900, Bd. 78, S. 71. — (7) Ebenda, 1905, Bd. 79, S. 4. — (8) Botan. Unters. über Schimmelpilze, 1889, Heft 8, S. 223. *__Butkewitsch,__ (1) Jahrb. wiss. Bot., 1903, Bd. 38, S. 147. *__Calmette,__ (1) Ann. Pasteur, 1892, Bd. 6, S. 605. *__Chrzaszcz,__ T., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1901, Bd. 7, S. 326 u. 913. *__Coker,__ (1) Journ. appl. Micr. and Labor. Methods, 1903, Bd. 6, S. 2411. *__Collette,__ Auguste, und __Boidin,__ Auguste, (1) Bulletin de l'Association des chimistes de sucr. et de distill. 1898,

Bd. 16, S. 862. ***Cornu,** (1) Bull. Soc. botan. de France, 1876, Bd. 23, S. 213. ***Costantin** und **Lucet,** (1) Bulletin Soc. Mycol. de France, 1903, Bd. 19, S. 200. ***Dauphin,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1904, Bd. 138, S. 154. — (2) Ebenda, 1904, Bd. 139, S. 482; Bd. 141, S. 533. ***Delbrück,** M., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1899, Bd. 22, Ergänzungsheft 1. ***Diakonow,** (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1886, Bd. 4, S. 1. ***Eidam,** (1) Jahresb. der Schles. Ges. f. vaterl. Kultur, 1883, Bd. 61, S. 232. ***Eijkman,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1894, Bd. 16, S. 99. ***Falck,** (1) Beitr. z. Biol. d. Pflanz., 1901, Bd. 8, S. 213. ***Fernbach,** (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1899, Ergänzungsheft 1. ***Fischer,** Alfred, (1) In: Rabenhorst, Kryptogamenflora, 2. Aufl., Bd. 1, 4. Abt. (Phycomycetes). Leipzig 1892. ***Fresenius,** (1) Beiträge zur Mykologie. 1850. ***Gayon,** (1) Mém. Soc. des Sciences de Bordeaux, 1878, 2. sér., Bd. 2, S. 249. — (2) Ann. de chim. et de phys., 1874, 5. sér., Bd. 14, S. 258. ***Gayon** und **Dubourg,** (1) Ann. Pasteur, 1887, Bd. 1, S. 532. ***Gedoelst,** (1) Les champignons parasites de l'homme et des animaux domestiques. Brüssel 1902. ***Guéguen,** F., (1) Les champignons parasites de l'homme et des animaux. Paris 1904. ***Günther,** E., (1) Dissert., Erlangen 1897. ***Hansen,** E. Chr., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1888, Bd. 2, S. 143. — (2) Ebenda, 1902, Bd. 5, S. 64. ***Hartig,** R., (1) Forstl.-naturw. Zeitschrift, 1897, Bd. 6, Heft 9. ***Harz,** C. O., (1) Landwirtschaftl. Samenkunde. Berlin 1885, Bd. 2, S. 892. ***Hauman,** (1) Ann. Pasteur, 1902, Bd. 16, S. 379. ***Häyrén,** (1) Medded. af Soc. pro fauna et flora fennica, 1904, H. 29, S. 162. ***Henneberg,** (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1902, Bd. 25, S. 205. ***Johan-Olsen,** O., (1) Centralbl., f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 161. ***Klebs,** (1) Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. Jena 1896, S. 492 u. f. — (2) Jahrb. wiss. Bot., 1898, Bd. 32, S. 1. — (3) Bot. Ztg., 1902, Bd. 60, S. 178. ***Kostytschew,** (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1904, Bd. 22, S. 209. — (2) Ebenda, 1902, Bd. 20, S. 327. ***Lafar,** Fr., (1) Technische Mykologie, 1. Aufl., 1901, Bd. 2, S. 441. ***Léger,** (1) Recherches de la structure des Mucédinées. Thèse de Paris. Poitiers 1896. ***Lichtheim,** (1) Zeitschrift f. klin. Medic., 1884, Bd. 7, S. 148. ***Lindau,** G., (1) Notizblatt d. Königl. Botan. Gartens u. Museums zu Berlin, 1901, Nr. 26, S. 119. ***Lindner,** P., (1) Mikroskopische Betriebskontrolle etc., 4. Aufl., 1905, S. 234. ***Lombroso,** (1) La Pellagra. Roma 1878. ***Lucet** und **Costantin,** (1) Arch. de Parasitologie, 1901, Bd. 4, S. 400. — (2) Ebenda, S. 362. ***Mac Alpine,** (1) Department of Agricult., Victoria, Melbourne, 1902, S. 84 u. 96. — (2) Agricult. Gaz. of N.-S.-Wales, 1900, S. 1. ***Massee,** (1) Kew Bull., June 1901, S. 94. ***Matruchot,** (1) Annales Mycologici, 1903, Bd. 1, S. 45. ***Maximow,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 9, S. 193. ***Miehe,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1906, Bd. 16, S. 430. ***Miyoshi,** (1) Bot. Ztg., 1. Abt., 1894, Bd. 52, S. 1. ***Moeller,** Alfr., (1) Zeitschrift f. Forst- u. Jagdwesen, Berlin, 1903, Heft 5, S. 257. ***Morini,** (1) Malpighia, 1896, Bd. 10. ***Namyslowski,** B., (1) Bull. de l'Acad. des Sciences de Cracovie, Cl. math. et nat., Juillet 1906, S. 677 u. f. ***Nechitch,** (1) Institut de Botanique, Univers. de Genève, 1904, 6. sér., Heft 5, S. 38. ***Neuville,** (1) Les ferments industriels de l'Extrême Orient. Paris 1902. ***Nikitinski,** (1) Jahrb. wiss. Bot., 1904, Bd. 40, S. 1. ***Nikolsky,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 12, S. 554. ***Nordhausen,** (1) Jahrb. wiss. Bot., 1898, Bd. 33, S. 1. ***O'Brien,** (1) Bulletin Torrey Botanical Club, 1902, Bd. 29, S. 170. ***Oudemans,** (1) Nederl. Kruidk. Archief, 1902, 2. Deel, 3. Stuk, S. 719, und Archives Néerlandaises des Sciences exactes et nat., 1902, 2. sér., Bd. 7, S. 278; auch Beihefte z. Bot. Centralbl., 1902, Bd. 1, S. 6. ***Pasteur,** L., (1) Etudes sur la bière. Paris 1876, S. 126. ***Pinoy,** (1) Bull. de l'Institut Pasteur, 1903, Bd. 1, S. 761 u. 809. ***Porodko,** (1) Jahrb. wiss. Bot., 1904, Bd. 41, S. 1. ***Prinsen Geerligs,** (1) Chem.-Ztg., 1896, Bd. 20, S. 67. ***Pulst,** (1) Jahrb. wiss. Bot., 1902, Bd. 37, S. 205. ***Raciborski,** (1) Parasit. Algen u. Pilze Javas, I., 1900, S. 11. ***Reess,** M., (1) Botanische Untersuchungen über Alkoholgärungspilze. Leipzig 1870, S. 52. ***Rickmann** und **Kaesewurm,** (1) Notizblatt d. Kgl. Botan. Gartens u. Museums zu Berlin, 1900, Nr. 24, S. 65. ***Saccardo,** (1) Sylloge fungorum etc., Bd. 7, S. 190 u. 212; Bd. 9, S. 335; Bd. 11, S. 239; Bd. 14, S. 432 u. 435; Bd. 16, S. 382 u. 386; Bd. 17, S. 494 u. 502. ***Saito,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 13, S. 154. — (2) Ebenda, S. 157. — (3) Ebenda, 1905, Bd. 14, S. 623. — (4) Journ. of Coll. Scienc. Imper. Univers. Tokyo, 1905, Bd. 19, Artikel 19, S. 1. — (5) Ebenda, 1904, Bd. 18, Artikel 5. — (6) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1906, Bd. 17, S. 20 u. f. ***Sanguineti,** (1) Ann. Pasteur, 1897, Bd. 11, S. 267. ***Schäffer,** (1) Dissert., Erlangen 1901. ***Schostakowitsch,** W., (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1896, Bd. 14, S. 260. — (2) Ebenda, 1897, Bd. 15, S. 226 u. 471. — (3) Zeitschrift f. angewandte Mikroskopie, 1903, Bd. 8, S. 5 u. 62. — (4) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1898, Bd. 16, S. 155. — (5) Ebenda, S. 91. ***Schröter,** A., (1) Flora, 1905, Bd. 45, S. 1. ***Schroeter,** J., (1) Mucorineae in: Engler und Prantl, Die natürlichen Pflanzenfamilien, I. Teil, 1. Abt., Leipzig 1897, S. 119 u. f. — (2) Kryptogamenflora Schlesiens, 1889, Bd. 3, 1. Abt., S. 204. ***Schützenberger,** (1) Die Gärungserscheinungen. Leipzig 1876, S. 54. ***Siebenmann,** (1) Die Schimmelmycosen des menschlichen Ohres. 2. Aufl.,

1889, S. 98. ***Sitnikoff** und **Rommel,** (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1900, Bd. 23, S. 391. ***Smith,** A. L., (1) Journ. Microsc. Soc. London, 1901, S. 618. ***Spegazzini,** (1) Revista Argentin. de Hist. Nat., I. Buenos Aires, 1891, S. 4, und Anal. Mus. Nacion. Buenos Aires, 1899, Bd. 6, S. 204. ***Swingle,** D. B., (1) U. St. Departm. of Agricult., Washington, 1903, Bulletin Nr. 16. ***Tavel,** F. **von,** (1) Vergleichende Morphologie der Pilze. Jena 1892. ***van Tieghem,** (1) Ann. des Sciences nat., Botan., 1873, 5. sér., Bd. 17. — (2) Ebenda, 1875, 6. sér., Bd. 1, S 94. — (3) Ebenda, Bd. 4, S. 396. — (4) Ebenda, S. 1. — (5) Traité de Botanique, Bd. 2. — (6) Comptes rend. de l'Ac., 1872, Bd. 74, S. 997. ***Turquet,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1902, Bd. 135, S. 912. ***Vuillemin,** P., (1) Bull. Soc. botan. de France, 1888, Bd. 23, S. 236. — (2) Bull. Soc. des Sciences de Nancy, 1886, Bd. 19, S. 92. — (3) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 409. — (4) Revue mycologique, 1902, Bd. 24, Nr. 93, S. 1; Nr. 94, S. 45. — (5) Comptes rend. de l'Ac., 1902, Bd. 134, S. 366. — (6) Bull. Soc. Mycol. de France, 1903, Bd. 19, S. 106. — (7) Annales Mycologici, 1904, Bd. 2, S. 61. — (8) Bull. Soc. des Sciences de Nancy, 1902, 3. sér., Bd. 3, S. 21. — (9) Bull. Soc. botan. de France, 1902, Bd. 49, S. 16. — (10) Bull. Soc. des Sciences de Nancy, 1903, 3. sér., Bd. 4, S. 239; Comptes rend. de l'Ac., 1903, Bd. 137, S. 869. — (11) Etudes biologiques sur les Champignons. Nancy 1887. — (12) Arch. de Parasitologie, 1904, Bd. 8, S. 562. ***Wehmer,** C., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1900, Bd. 6, S. 353. — (2) Ebenda, S. 610. — (3) Ebenda, 1901, Bd. 7, S. 313. — (4) Annales Mycologici, 1903, Bd. 1, S. 37. — (5) Beiträge zur Kenntnis einheimischer Pilze. 2. Heft, Jena 1895. — (6) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1904, Bd. 22, S. 476. — (7) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 13, S. 277; 1905, Bd. 14, S. 556; Bd. 15, S. 8. — (8) Ebenda, 1904, Bd. 13, S. 277. — (9) Chem.-Ztg., 1897, Bd. 21, Nr. 98. ***Went** und **Prinsen Geerligs,** (1) Verhandl. Koninkl. Akad. v. Wetenschappen te Amsterdam, 1895, Tweede sect., Deel IV, Nr. 2. ***Wevre,** (1) Bull. des séances de la Soc. Belge de Microscopie, 1892, Bd. 18, Nr. 7, S. 133 u. f. ***Winkler,** W., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1902, Bd. 8, S. 721. ***Wortmann,** J., (1) Bot. Ztg., 1881, Bd. 39, S. 385. ***Zimmermann,** O. E. R., (1) Das Genus Mucor. Chemnitz 1871. ***Zopf,** (1) Verh. d. botan. Ver. d. Prov. Brandenburg, 1881, Bd. 23, S. 22. — (2) Die Pilze in morpholog., biolog. u. system. Beziehung. Breslau 1890. S. 313.

(Manuskript-Einlauf: 6. März 1907.)

22. Kapitel.

Chemische Wirkungen der Mucoreen.

Von Prof. Dr. C. Wehmer.

§ 109. Alkoholische Gärung.

Eine Erscheinung von hervorragend wissenschaftlichem Interesse ist die im vorhergehenden wiederholt berührte Fähigkeit von *Mucor*-Arten zur Umbildung von Zucker in Alkohol, alle bislang darauf untersuchten Species besitzen sie; eine Ausnahme machen nach kürzlich erfolgter Mitteilung Miehe's (1) aus dem Jahre 1907 jedoch *M. pusillus* und *M. corymbifer*. Diese seit fast vier Dezennien bekannte Tatsache hat schon oft das Interesse der Forscher erregt und ist in der Literatur wiederholt eingehend diskutiert. Wenngleich man die Erscheinung kurz als Alkoholgärung bezeichnete, so unterschied man sie bislang doch scharf von dem gleichbenannten durch Saccharomyceten bewirkten Prozeß: Die alkoholische Gärung durch echte Hefen verläuft bekanntlich neben der Sauerstoffatmung auch bei vollem Luftzutritt, diejenige durch Mucoreen dagegen galt als Begleiterscheinung der intramolekularen Atmung, also als Folge des Luftabschlusses. *Mucor*-Arten sollten also Alkohol nur bei erschwertem Sauerstoffzutritt

bilden, die Hefen dagegen auch bei reichlicher Anwesenheit von Luft; Näheres darüber wolle man auf S. 430 u. f. des Zweiten Bandes der 1. Auflage nachlesen. Diese Sachlage hat sich inzwischen jedoch verschoben. Nach dem, was wir heute über die Mucorgärung wissen, besteht jener Unterschied nicht mehr; auch sie ist, wie hier noch zu zeigen sein wird, in ganz demselben Sinne eine echte alkoholische Gärung. Im übrigen ist dies nicht der Ort, auf die Beziehungen der intramolekularen Atmung (s. Bd. I, S. 324) zur Alkoholgärung einzugehen, nach neueren Forschern, wie Godlewski (1), Stoklasa (1) u. a., liegt ein Grund zur Trennung der letzteren von der Alkoholbildung bei der intramolekularen Atmung nicht vor. Man sehe dazu auch die Darstellungen bei Jost (1) wie Czapek (1) ein, indes andere Forscher wieder beide Vorgänge als nicht identisch betrachten, so Palladin und Kostytschew (1) u. a.

Wie das der Saccharomyceten, so ist auch das Gärvermögen der Mucoreen hinsichtlich der Intensität sehr verschieden, durchschnittlich erscheint es hier freilich etwas schwächer, immerhin kennen wir Arten, die hinter leistungsfähigen Hefen, was Schnelligkeit der Zuckerspaltung und Vergärungsgrad betrifft, nicht viel zurückstehen. Ausgesprochen ist es z. B. bei einigen Arten der *Cymomucor*-Gruppe (*Mucor circinelloides*, *M. alternans*, *M. javanicus*), bei *M. erectus*, etwas schwächer bei *M. Rouxii*, *Rhizopus tonkinensis*, *Rh. japonicus*, *M. racemosus*, deutlich wahrnehmbar aber auch bei *M. plumbeus* (= *M. spinosus*), *M. piriformis*, *M. hiemalis*, *M. tenuis*, *M. fragilis*, *Rhizopus chinensis*, *Rh. Tamari*, *Rh. Tritici*, während endlich *M. Mucedo* und *Rhizopus nigricans*, als die bekanntesten, kaum noch oder keine deutlichen Gärungserscheinungen zeigen, wenn auch geringe Alkoholmengen bilden. Wie sich die übrigen *Mucor*- und *Rhizopus*-Species stellen, wäre noch zu ermitteln; neuere exakt durchgeführte Gärversuche sind überhaupt erwünscht, das vorliegende Material ist mit wenigen Ausnahmen älteren Datums.

Das Bild der Mucoreengärung weicht in einigen nebensächlichen Punkten von dem der Saccharomyceten-Gärung ab, fällt übrigens auch wieder verschieden aus, je nachdem ob Luft zutreten kann oder abgesperrt wird. Stets bleibt die gärende Flüssigkeit — wie das auch früher schon Pasteur wie Gayon bemerkten — wasserklar und ohne feine Trübung, die Mycelien des Pilzes sammeln sich dabei entweder an der Oberfläche als zusammenhängendes Ganze (so bei vollem Luftzutritt) oder flottieren innerhalb der Flüssigkeit als Flockenmassen oder endlich — so bei strengem Luftabschluß — lagern sie sich unter Zerfall in Kugelzellen als voluminöser Satz vorzugsweise auf dem Gefäßboden, so das Bild einer „Untergärung" bietend. Sobald ein dem Auge merkliches Trübwerden der Gärflüssigkeit eintritt, darf das als sicheres Zeichen einer Infektion durch Hefen oder Bakterien gelten. In den beiden ersten Fällen sammeln sich vereinzelte große Gasblasen nur an den Mycelien, im letzten steigt Gas träge oder schneller zumal vom Bodensatz auf; gärkräftige Arten, wie *M. javanicus* u. a., weisen dann während der Hauptgärung sonst ganz das Bild einer kontinuierlich Gas entbindenden Saccharomyceten-Gärung auf. Bei frei auf großen Flüssigkeitsoberflächen sich entwickelndem Mycel fehlt sichtbare Gasentbindung ganz; man darf das natürlich nicht als ausbleibende Gärung nehmen, wie das anscheinend von früheren Forschern geschehen ist, die große Oberfläche begünstigt lediglich ein schnelleres Entweichen, verhindert also (gleichwie Lüftung) eine Uebersättigung der Gärflüssigkeit mit Kohlensäure, deren Folge sonst das bekannte Entweichen in Bläschen-

form ist. Eintritt der Gärung, d. h. Umbildung von Zucker in Alkohol ist also — wie wir hier vorweg feststellen — weder vom Luftabschluß noch vom Zerfall des Mycels in Kugelzellen resp. Kugelhefe abhängig (vergl. über diese S. 461). Damit kommen 5 wir sogleich zu dem Hauptpunkt unserer Darstellung, der auch in der Geschichte dieser Gärung eine wichtige Rolle spielt. Durch die ganze hierhergehörige Literatur zieht sich wie ein roter Faden die Erörterung der **Kugelhefe** als vorzugsweises oder alleiniges Agens der Mucoreengärung, und selbst heute findet man — trotz der klaren gegenteiligen 10 Feststellung u. a. bei Zopf (1) bereits im Jahre 1890 — noch die Ansicht vertreten, daß das Gärvermögen insbesondere des vielgenannten *Mucor racemosus* in Kausalverbindung mit der Bildung sprossender Kugelzellen steht, „die physiologische Tätigkeit der Zuckerspaltung muß — wie im Jahre 1902 Ad. Mayer (1) sagt — „in nahem Zusammen- 15 hang zu der Art der Fortpflanzung durch Sprossung stehen". Aehnlich spricht sich auch Schützenberger (1) aus. Im ganzen entspringt diese Meinung wohl mehr dem Wunsche, die Mucorgärung der Saccharomycetengärung näher zu bringen, trotzdem ja hinlänglich bekannt und auch gleichfalls schon u. a. von Zopf (1) ausdrücklich konstatiert worden 20 ist, daß Gärvermögen keineswegs eine Eigentümlichkeit aller Sproßpilze, somit nicht notwendige Folge der Vermehrung durch Knospung ist.

Als Entdecker der Mucorhefe gilt Bail (2), dem wir hier einen kurzen Exkurs widmen müssen, denn er wird heute nicht immer richtig und im ganzen wohl zu günstig beurteilt, wir finden in seinen ver- 25 schiedenen Arbeiten gute Beobachtungen neben hinfälligen Behauptungen. Bail hat zweifelsohne im Jahre 1857 neben zerfallenden Hyphen richtige sprossende Mucorzellen („großzellige Kugelhefe" nach seiner Bezeichnung) vor sich gehabt, als er die Sporen zweier unbestimmter Mucorspecies (I und II) unter Deckglas in Würze liegend näher verfolgte: 30 am Rande des Deckglases trieben sie Keimschläuche, in Mitte desselben nach starker Anschwellung dagegen Sproßzellen; er verwechselt letztere zunächst auch keineswegs mit *Saccharomyces*-Zellen (damals *Hormiscium* genannt). Die Gärwirkung dieser seiner „Mucorideen-Hefe" hat unser Forscher dagegen schwerlich gesehen, denn wenn er, gestützt auf jene 35 Beobachtung, 10 Jahre später an anderer Stelle (1) angibt, daß allgemein die in gärfähige Flüssigkeit (Würze) „versenkten Pilzsamen nicht in Schläuchen auskeimen sondern direkt durch Sprossung Hefe bilden", so ist das schon deshalb unzutreffend, weil eben bei dieser veränderten Versuchsanordnung Mucorsporen stets zunächst zu Mycelien aus- 40 keimen; gerade submerse Lebensweise bezw. Wachstum innerhalb des Substrats ist allen Mucormycelien eigen. Auch über die anstoßgebende Ursache der Knospung war er übrigens trotz der ersten richtigen Beobachtung jedenfalls anfangs im unklaren, denn er sucht sie nicht im Luftmangel sondern in dem „Einfluß des Mediums" (der Würze), erst im 45 Jahre 1867 betont er die luftfreie Maische. Bail's Gärungen waren wohl in der Hauptsache notorische Hefegärungen. Daß seine Gärversuche tatsächlich mit Hefe infiziert waren, beweist er selbst (1 u. 3) unabsichtlich dadurch, daß er die gleiche Beobachtung der Hefebildung bei Aussaat von *Penicillium* und *Botrytis* machte; diese beiden Pilze 50 lieferten ihm hiernach die Bierhefe und Weinhefe der Praxis. Seine Folgerungen werden so immer gewagter, schließlich führt er (1) auch die Gärung des Danziger Jopenbieres nicht auf eine besondere Bierhefe sondern auf die zu Boden sinkende hefeerzeugende Penicilliumdecke

zurück, und Mucorhefe läßt er (4) sich in echte Bierhefe umwandeln: Das Nebeneinander wird zum Auseinander, und unser ursprünglich von einwandfreien Beobachtungen ausgegangener Forscher entpuppt sich als ein überzeugter Vertreter der auch heute in der Aera der Reinkulturen noch nicht ganz ausgestorbenen Sekte der biologischen 5 Verwandlungskünstler. Zu erweisen, daß die Hefepilze nicht Organismen sui generis sondern Entwicklungsformen von Mycelpilzen seien, war der ausgesprochene Zweck von BAIL's (1) Versuchen geworden.

Mit Recht wurde dann im Jahre 1864 von A. DE BARY (1) darauf hingewiesen, daß gärungserregende Hefezellen unter solchen Umständen 10 jedenfalls aus Sporen von *M. Mucedo* nicht hervorgehen; welche Species BAIL vorlagen, ist heute natürlich nicht mehr festzustellen (*M. racemosus?*). Wenige Jahre später (1869) modifizierte A. DE BARY (2) freilich seine Ansicht, er läßt — anscheinend unter dem Eindruck der Untersuchungen von REESS — nicht nur *M. racemosus* sondern auch *M. Mucedo* 15 in von der Luft abgeschlossenen Medien Kugelzellen bilden, auch die ausgesäten Sporen sich direkt durch Sprossung vermehren, und vertritt diesen Standpunkt noch im Jahre 1884 in seiner Vergleichenden Morphologie und Biologie der Pilze. Bestimmte Feststellungen liegen aus dieser Zeit aber zunächst nur von REESS (1) vor, der im Jahre 1870 bei 20 den genannten beiden Pilzen Kugelhefebildung unter Gärungserscheinungen nach Untertauchen in gärfähige Flüssigkeiten beobachtet haben will und dafür den gehemmten Luftzutritt verantwortlich macht. Offenbar war aber auch REESS über die Art der Pilze, von denen jene Kugelzellen stammten, nicht ganz im klaren — selbst heute herrscht 25 da noch eine gewisse Verwirrung —, zutreffend ist jedoch dessen weitere Angabe, daß *Rhizopus nigricans* keine Kugelhefe bildet, auch Gärungserscheinungen nicht hervorruft.

Der bis dahin vernachlässigten und noch ganz ungeklärten chemischen Seite des Vorganges nahm sich dann zuerst FITZ (1—3) in den 30 Jahren 1873—1876 durch Identifizierung der Gärprodukte (Alkohol, Kohlensäure) an; hier finden wir auch sonst wesentlich präzisere Angaben. Durch Aussaat der Sporen eines von Pferdemist gewonnenen *Mucor* — anfänglich als *M. Mucedo*, später als *M. racemosus* bezeichnet — in Traubenmost oder künstlich zusammengesetzte Nährlösung (Zucker 35 mit Mineralsalzen) erhielt FITZ bei Luftzutritt zunächst Mycelien, weiterhin dann innerhalb der Flüssigkeit auch zu „Mucorhefe" — das waren wohl im wesentlichen nichtsprossende Kugelzellen — zerfallende Hyphen; bei Verdrängung der Luft durch Kohlensäure (also bei Sauerstoffabschluß) bildete sich aber hauptsächlich Kugelhefe 40 unter gleichzeitigen Gärungserscheinungen d. h. sichtbarer Gasentbindung. Hier ist also wohl das erste Mal experimentell der Hyphenzerfall in der gärenden Flüssigkeit hervorgerufen, auch vermerkt, daß dazu ein bloßes Aussäen des Pilzes in die Nährflüssigkeit nicht genügt. Auf sonstige chemische Feststellungen der FITZ'schen Arbeiten kommen 45 wir noch unten zurück.

Chronologisch folgen jetzt die Arbeiten PASTEUR's (1) und BREFELD's (1), ersterer die physiologische, letzterer die morphologische Seite der Mucorgärung in den Vordergrund stellend. Bei PASTEUR finden wir im Jahre 1876 den durch eindeutige feine Bilder der Mucorhefe 50 geführten exakten Nachweis, daß dieses offenbare Sproßstadium durch Sauerstoffabschluß bedingt wird (*M. racemosus*), bei *M. Mucedo* jedoch — wie auch Gärungserscheinungen — ausbleibt, wennschon hier gleich-

falls etwas Alkohol entsteht. Zweck der PASTEUR'schen Experimente war speziell der Beweis, daß gerade Luftabschluß die Gärung verursacht, derselbe übersah anscheinend und unerklärterweise die Tatsache, daß — wie wir heute annehmen müssen — sein *Mucor* auch bei vollem 5 Sauerstoffzutritt Alkoholgärung erregt hätte. Die in demselben Jahre erschienene Arbeit BREFELD's (1) über die Beziehungen zwischen Sauerstoffmangel, Kugelhefebildung und Alkoholgärung vertritt ungefähr den gleichen Standpunkt, sein *Mucor* sollte bei Luftzutritt ausdrücklich den Zucker zu Kohlensäure und Wasser verbrennen, bei Abschluß 10 der Luft unter Sprossungserscheinungen ihn dagegen vergären. Irgendwelche Beweise gerade für den ersten Punkt sind hier aber gleichfalls nicht beigebracht. Im übrigen begegnen wir bei BREFELD zum ersten Male neben einwandfreien Reinkulturen einer genauen Charakterisierung seines Versuchspilzes, dessen damaliger Name (*Chlamydo-* 15 *mucor racemosus*) heute indes in *Mucor racemosus* zu verändern ist (s. S. 475). Auch BREFELD — der (2) übrigens späterhin (im Jahre 1889) die Benennung „Mucorhefe" verwirft — läßt die schwache Gärung bei *M. Mucedo* und *Rhizopus nigricans* mangels eines Sproßzustandes zutreffend durch die Mycelien zustande kommen.

20 Mit der Kugelhefe einer Anzahl weiterer Arten, wie *M. circinelloides*, *M. alternans*, *M. plumbeus* (= *M. spinosus*), *M. erectus*, *M. fragilis*, beschäftigen sich weiterhin besonders französische Forscher, so im Jahre 1874 VAN TIEGHEM (1), im Jahre 1878 GAYON (1), im Jahre 1884 BAINIER (1), im Jahre 1887 GAYON und DUBOURG (1); letztere beiden 25 gehen so weit, daß sie selbst die diastatische und zuckerspaltende Wirkung des *M. alternans* an diese bei Sauerstoffmangel entstehende Entwicklungsform knüpfen, und wenn auch BAINIER die durch das Mycel des *M. circinelloides* bewirkte Gärung nicht gerade zu übersehen scheint, so ist man doch im ganzen auf dem besten Wege einer bis heute an- 30 dauernden ungerechtfertigten Ueberschätzung der vermeintlich durch besondere physiologische Wirkungen ausgezeichneten Mucorhefe.

Rekapitulierend stellen wir also folgendes fest. Einigkeit herrscht — und das gilt ebenso für die Arbeiten späterer Untersucher, wie E. CHR. HANSEN (2), KLEBS (1), WEHMER (1—4), — hinsichtlich der Ent- 35 stehungsbedingungen unserer Kugelhefe bezw. Kugelzellen: Absperren des Pilzes vom Luftzutritt hat speziell bei den Hyphen Septenbildung, Zerfall in anschwellende kuglige Zellen und Knospungserscheinungen dieser zur Folge. Wenn sich die einzelnen Species da auch sehr ungleich verhalten, also einige überhaupt nicht reagieren (*M.* 40 *Mucedo*, *Rhizopus nigricans*), andere nur träge und gewöhnlich nur bis zur Kugelzellbildung kommen (*M. Rouxii*, *M. piriformis*, *M. spinosus*, *Rhizopus tonkinensis* u. a.), wieder andere dagegen mehr oder minder lebhaft (*M. racemosus*, *M. javanicus*, *M. circinelloides* u. a.) gleichzeitig Sprossungserscheinungen zeigen, so steht die Tatsache selbst doch hin- 45 reichend fest; es ändert daran nichts, daß — zumal nach Feststellungen von KLEBS (1) — auch Umstände anderer Art, wie chemische oder physikalische Aenderungen der Zusammensetzung der Nährlösung, ähnliche Wirkung haben können.

Ob nun aber die **Gärwirkung** kausal von dieser Hefebildung und 50 somit auch vom Luftabschluß abhängt, ist eine Frage, die durch die früheren auf diesem Boden stehenden Arbeiten keineswegs bewiesen ist; in keiner derselben findet sich auch nur der Versuch eines exakten Nachweises dafür, daß bei ungehindertem Luftzutritt Alkoholbildung

nicht stattfindet. Die genannten *M. Mucedo* und *Rhizopus nigricans* und andere erweisen zunächst, daß — wie selbst Ad. Mayer (1) zugeben mußte — bescheidene Gärwirkung wenigstens ohne Hefebildung möglich ist, und gleiches zeigen die neueren Erfahrungen mit den alkoholbildenden ostasiatischen Verzuckerungspilzen (*M. Rouxii*, *Rhizopus tonkinensis*, *Rh. japonicus*); trotzdem diese zufolge Calmette (1), Sanguineti (1), Henneberg (1) u. a. 3—4 Proz. Alkohol und darüber erzeugen können, ändert sich die Form ihres in der Nährflüssigkeit flottierenden Mycels in keiner Weise. Für die von früheren Forschern benutzten Versuchspilze bedurfte die Frage immerhin noch einmal spezieller Prüfung, und es sind unter diesem Gesichtspunkt neuerdings zunächst *M. racemosus*, *M. plumbeus* (— *M. spinosus*) — neben den neueren Arten *M. javanicus*, *M. Rouxii*, *M. piriformis*, *M. hiemalis*, *Rhizopus Oryzae*, *Rh. tonkinensis* — von Wehmer (1 u. 4) untersucht worden, wobei sich dann ergab, daß sämtliche im Gärungssaccharometer meist sehr reichlich Gas entwickelten, ohne zunächst Kugelhefe zu bilden. Also auch für diese steht hiernach fest, daß die Gärwirkung gerade so gut vom gewöhnlichen Mycel ausgeht und dafür kein Sproßzustand erforderlich ist.

Es bleibt somit noch die Hauptfrage zu beantworten, ob die eintretende Alkoholgärung tatsächlich vom Sauerstoffmangel bedingt wird, also der intramolekularen Atmung gleich steht, wie das von früheren Forschern behauptet, übrigens daraufhin auch neuerdings noch angenommen ist, so von Godlewski (1), Klebs (1), auch allgemein in der Literatur zum Ausdruck kommt; vergl. Pfeffer (1), auch Schützenberger (1). Neuere Feststellungen für *M. racemosus* und *M. javanicus* haben aber auch hier das Gegenteil ergeben, selbst durch reichliche Luftzufuhr wurde in bezüglichen Experimenten Wehmer's (2 u. 3) die Alkoholbildung in keiner Weise gestört. Der Beweis für diese, die Mucorgärung der Saccharomycetengärung gleichstellende Tatsache läßt sich einwurfsfrei durch kontinuierliche Lüftung der gärenden Flüssigkeit oder durch Verwendung sehr niedriger Flüssigkeitsschicht bei großer Oberfläche führen. Unter solchen eine reichliche Sauerstoffversorgung gewährleistenden Umständen bleibt allerdings die für das Auge sichtbare Entwicklung von Gasblasen aus, trotzdem enthält die analysierte Flüssigkeit nicht weniger Alkohol als bei partiellem oder auch totalem Luftabschluß. Gegenüber diesen experimentell festgelegten Tatsachen können die früheren Angaben ohne genaueren Nachweis kaum mehr ins Gewicht fallen, auch liegt kein Grund vor, anzunehmen, daß andere Species sich da gänzlich verschieden verhalten. So entstanden nach Wehmer (2 u. 3) an Vol.-Proz. Alkohol:

	M. racemosus	*M. javanicus*
1. Bei Luftabschluß (unter Gärverschluß)	2,16 Proz.	3,85—5,44 Proz.
2. Bei mäßigem Luftzutritt (unter Watteverschluß)	2,51 „	3,56—4,29 „
3. Bei kontinuierlicher Lüftung der Gärflüssigkeit	2,51 „	3,56—6,60 „
4. Bei reichlichem Luftzutritt (in 2—8 mm hoher Flüssigkeitsschicht in großen Doppelschalen, ohne Korrektur für Verdunstung)	1,75 „	3,64—4,65 „

Die reichliche Versorgung der Pilze mit Luftsauerstoff hat aber, wie die Analyse dieser hier nicht weiter zu diskutierenden Versuche ergab, einen außerordentlich günstigen Einfluß auf das Wachstum derselben

(vielfaches Erntegewicht) sowie auf den Umsatz des gebotenen Zuckers (in gleichen Zeiten bis gegen das Doppelte), es ist also auch das nicht anders als bei der durch Saccharomyceten bewirkten Gärung.

Von einer anderen Seite her kommt neuerdings KOSTYTSCHEW (2), 5 der den Gaswechsel von *M. racemosus*, *M. Mucedo* und *Rh. nigricans* in Luft und Stickstoff untersuchte, übrigens zu der gleichen Folgerung hinsichtlich des Sauerstoffeinflusses auf die Gärung; die Kohlensäureproduktion war in beiden Fällen nahezu gleich ergiebig. —

Wir übergehen hier naturgemäß die mancherlei bereits bei der 10 alkoholischen Gärung (s. d. 18. Kap.) erörterten Punkte: nur einzelnes, wie das Verhalten der Mucoreen gegen die verschiedenen Zucker, die Alkoholgrenze, sonstige Produkte des gärenden Pilzes, Verhältnis zwischen Alkohol und Kohlensäure u. a., ist noch kurz zu berühren.

Ob der Anstoß zur Alkoholbildung wie bei den Hefen von 15 einer nach heutiger Auffassung enzymartigen Substanz oder wohl besser von einem unbelebten Substanzgemenge ausgeht und auch tote Zellen zunächst noch gleiche Wirkung haben, ist neuerdings von KOSTYTSCHEW (2) untersucht und in bejahendem Sinne beantwortet worden, wenigstens zeigten Acetondauerpräparate von *Rh. nigricans*, *M. racemosus* sowie *M.* 20 *Mucedo* einen ähnlichen Gaswechsel wie lebende Kulturen: Alkoholbestimmungen sind hier allerdings nicht gemacht worden. Die Möglichkeit zur Anhäufung des Alkohols ist jedenfalls erst durch Unfähigkeit des betreffenden Pilzes zur Weiterzersetzung desselben gegeben. So wirkten auch *M. racemosus* wie *M. javanicus* auf den der Nährlösung 25 zugesetzten Alkohol nicht nachweisbar ein, 3—5 Proz. genügten vielmehr, ihre Entwicklung unter den innegehaltenen Bedingungen stark zu hemmen, und als einzige Kohlenstoffquelle neben Mineralsalzen gegeben, war sein Nährwert so gut wie gleich Null; vergl. WEHMER (2 u. 5). Die Verschiedenheit gegenüber den Aspergillaceen, welche Alkohol meist 30 lebhaft oxydieren, auch als Nährstoff verwenden können, liegt auf der Hand, schon dieserhalb könnte es bei Vertretern dieser letzteren Gruppe nur unter ganz bestimmten Bedingungen zu einer Alkoholansammlung (Gärung) kommen, während *Mucor*-Arten ihn selbst bei reichlichem Luftzutritt — der hierfür also keineswegs anstoßgebend ist — nicht 35 nachweisbar weiterzersetzen. Auf die hierzu in Gegensatz stehenden Angaben der früheren Literatur ist bereits oben hingewiesen worden. Im allgemeinen hinge also nachweisbares Auftreten bezw. Anhäufung dieses verbreiteten Zuckerspaltungsproduktes im Organismus weniger von dem Vorhandensein einer vielleicht stets gegebenen spaltenden Sub- 40 stanz als vielmehr von dem Oxydationsvermögen jenes ab, nur wo dieses mangelt, häuft es sich — ähnlich der Oxalsäure bei *Asperg. niger* — an. Im ganzen erscheint die übliche Vorstellung von diesen Vorgängen insofern noch als eine etwas rohe, als wohl allgemeiner weder Mangel an Sauerstoff anstoßgebend für das Erscheinen des Al- 45 kohols im Zellchemismus ist, noch dessen reichlicher Zutritt notwendig sein Verschwinden (Oxydation) veranlaßt. Alkohol und Sauerstoff stehen ebensowenig wie Oxalsäure und Sauerstoff in einer direkten näheren Beziehung zueinander, so selbstverständlich im übrigen Anwesenheit des letzteren für seine durch andere Momente bestimmte Oxy- 50 dation sein muß. Die Bedingungen für beide Reaktionen liegen tiefer, es entscheiden darüber einzig die besonderen Fähigkeiten des Organismus, auf die im übrigen natürlich wieder die obwaltenden Verhältnisse Einfluß üben. Der verlockenden Idee, die Gärungskohlensäure aus zer-

fallender Oxalsäure abzuleiten ($C_6H_{12}O_6 = 2C_2H_5OH + C_2H_2O_4$) wollen wir hier nicht folgen, wennschon das häufige Vorkommen von Alkohol neben Oxalsäure (zwei biochemischen Produkten weitester Verbreitung) gerade bei Mucoreen bemerkenswert scheint.

Die sonstigen **Gärungsbedingungen** chemischer und physikalischer Art werden auch bei diesen Pilzen von Zuckerart, Konzentration derselben, sonstigen Bestandteilen der Gärflüssigkeit und Temperatur gegeben. Gegenüber künstlichen Nährlösungen mit anorganischem Stickstoff sind natürliche Gemenge, wie Würze, Most, Dekokte süßer Früchte, auch hier günstiger, daß aber auch erstere mit Ammoniak- oder Nitratstickstoff neben Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat (bei Rohrzucker als Kohlenstoffquelle) ausreichen können, zeigte bereits Fitz (2 u. 3) für *M. racemosus*, dem er in einem Teil seiner Gärungen Salpeter oder weinsaures Ammoniak bot. Auch die Gärung durch Bier- oder Weinhefen ist bekanntlich nicht notwendig an Gegenwart organischen Stickstoffs gebunden. In dem größeren Versuch Emmerling's (1) wurden der Rohrzuckerlösung gleichfalls nur Mineralsalze (Kalisalpeter als Stickstoffquelle) zugesetzt. Fraglos gedeihen und gären viele Arten aber ungleich besser in Flüssigkeiten von der Zusammensetzung der Würze, des Mostes u. a. Die Konzentration darf nur ausnahmsweise auf 15—20 Proz. der Zuckerart steigen, durchschnittlich muß sie wesentlich geringer sein (10 Proz. und darunter), stärker konzentrierte Nährlösungen sagen unseren Pilzen nicht zu. So entwickelt sich *M. racemosus* ungleich schneller in Bierwürze von ca. 7,5 Saccharometergraden als in der von doppeltem Gehalt, die andrerseits für *M. javanicus* freilich noch gut geeignet ist. Von einer Angabe bei Fitz abgesehen, liegt darüber in der Literatur wenig Genaueres vor. Dieser bestimmte die Kohlensäure, welche aus je 8 g Rohrzucker innerhalb 4 Monate durch *M. racemosus* in 2,5- bis 20-proz. Lösung gebildet war:

Zuckerprozente:	20	10	5	2,5
Gramm Kohlensäure:	1,54	1,85	2,69	3,58

Es sind diese Zahlen freilich nicht direkt vergleichbar, weil die Volumina in den vier Versuchen verschieden waren (40, 80, 160 und 360 ccm in gleicher Reihenfolge). Auch die Maischen der Praxis, für welche man die technischen Arten anwendet, haben relativ niedrige Konzentrationen.

Die günstigste Gärtemperatur ist von den verschiedenen Wärmeansprüchen der einzelnen Arten mit abhängig. Die Angabe von Fitz, derzufolge die Mucorgärungen mit Vorteil bei 25—28° anzusetzen sind, der Verlauf bei 15° aber sehr langsam sei, ist selbstverständlich nicht allgemeingültig, da kommt das Temperaturoptimum der Art zunächst in Frage. So gärt z. B. der *M. racemosus* jedenfalls besser bei mittlerer Temperatur und versagt gegen 30°, indes *M. javanicus* energischer bei diesem Wärmegrad, doch auch flott bei 16—20° gärt, trotz seines hoch liegenden Optimums. Größere Alkoholzahlen lieferten jedenfalls auch die in der Literatur vorliegenden Gärversuche bei etwas höheren Wärmegraden nicht, wenn im übrigen da auch die Alkoholgrenze früher erreicht wurde.

Am besten orientiert sind wir noch über die Bedeutung, welche die verschiedenen **Zuckerarten** für den Eintritt der Gärung haben. Hier hat der Rohrzucker zunächst unser Hauptinteresse, weil er nur von wenigen gespalten und vergoren wird (*M. racemosus* und *Rhizopus japonicus*

insbesondere), wenngleich er auch für andere Species ein geeignetes Substrat abgibt, also für Kulturzwecke verwendbar ist. Milchzucker scheint ganz allgemein nicht gärfähig zu sein (Fehlen des spaltenden Enzyms Lactase), dagegen aber Malzzucker, ob ohne vorhergehende 5 Inversion, steht dahin. Auf das Verhalten der verschiedenen Species gegen andere Zucker und Kohlenhydrate aus der Stärkegruppe ist im folgenden Paragraphen einzugehen. Im einzelnen liegen folgende Feststellungen vor.

Daß Rohrzucker von *M. racemosus* invertiert und vergoren wird, 10 ist bereits im Jahre 1873 durch Fitz (1) festgestellt, auch durch spätere Untersucher, so Brefeld (1), E. Chr. Hansen (1), Emmerling (1), bestätigt worden; es scheint diese Tatsache dafür zu sprechen, daß diesen vier Untersuchern tatsächlich der gleiche Pilz vorlag, vorausgesetzt, daß es nicht noch andere *Mucor*-Arten mit gleicher Eigenschaft gibt, was 15 zurzeit jedenfalls noch nicht sicher steht (s. unten). Fitz hebt ausdrücklich Freibleiben seiner Nährlösungen von Infektion, speziell Bakterien hervor, übrigens lag bei demselben eine gewisse Gewähr dafür auch schon in der Verwendung anorganischer Salze (Salpeter, Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat) neben Rohrzucker. Derselbe zog auch 20 Milchzucker neben Inulin, Dextrin sowie milchsauren Kalk — mit negativem Erfolg — zum Vergleich heran; der Pilz wuchs zwar auf den Lösungen aller dieser Stoffe, Gärung trat aber nur in milchzuckerhaltiger Flüssigkeit ein, wenn dieser Zucker vorher durch Säure invertiert worden war. Auch *M. alternans* wächst nach Gayon und 25 Dubourg (1) auf Rohrzucker ohne ihn invertieren zu können, also ohne Gärungserscheinungen. Der aus dem Jahre 1892 stammenden Angabe von Calmette (1), daß *M. Rouxii* Invertin bildet, ist im Jahre 1897 von Sanguineti (1) widersprochen worden; es fand nach diesem auf Rohrzuckerlösung keine Gärung und nur dürftiges Wachstum statt. Für *M.* 30 *alternans* machte Dubourg im Jahre 1899 die kurze Angabe, daß er Dextrose, Lävulose, Maltose, Trehalose, Galactose, aber nicht Rohrzucker, Milchzucker und Raffinose vergärt. Die Vergärung von Rohrzucker durch *Rhizopus japonicus* („*Amylomyces β*") gaben dann Sitnikoff und Rommel (1) an, welche vergleichende Versuche mit *Rh. tonkinensis*, *Rh.* 35 *japonicus* und *Mucor Rouxii* nach Lindner's (1) Methode in hohlgeschliffenen Objektträgern mit verschiedenen Zuckern ausführten; alle drei entwickelten Gas aus Dextrose, Lävulose, Maltose, Galactose, d-Mannose, Dextrin, aber allein *Rh. japonicus* aus Rohrzucker, Raffinose, Melibiose, Inulin, dagegen wirkten auf Trehalose nur *Rh. tonkinensis* und *M. Rouxii*, auf 40 α-Methylglucosid aber allein letztere Art. Ob nun die betreffenden Di- und Polysaccharide direkt oder nach vorheriger enzymatischer Spaltung vergoren werden, steht noch dahin, jedenfalls ist über die Enzyme nichts Näheres bekannt. Die Durcharbeitung derartiger Versuche vielleicht noch in etwas größerem Maßstabe würde zweifellos wichtiges Material 45 für die Unterscheidung der Mucoreen beibringen. P. Lindner (2) gibt über die letztgenannten Arten folgende Tabelle, in der starke Gärung durch 3, schwache durch 1 bezeichnet wird.

	Inulin	Trehalose	Rohrzucker	Melibiose	Raffinose	α-Methylglucosid
M. Rouxii	—	3	—	—	—	1
Rh. japonicus	3	—	3	2	2	—
Rh. tonkinensis . . .	—	3	—	—	—	—

Aehnlich dem *Rh. tonkinensis* verhält sich nach Saito (3) übrigens *Rh. Tamari*, der aber Rohrzucker vergärt (s. unten), während *Rh. japonicus var. angulosporus* sich wie *Rh. japonicus* verhält. Rohrzucker ist übrigens für die meisten unserer Arten ein wenn auch nicht immer gleich guter Nährstoff — eine gewisse Rolle spielt bei solchen Versuchen die Art der Stickstoffquelle — ohne dabei invertiert zu werden, so für *M. Mucedo, M. erectus, M. plumbeus* (= *M. spinosus*), *M. circinelloides*, *Rh. nigricans*. Mit Ausnahme der letztgenannten Art vergären diese aber Maltose, ebenso *M. alternans* und *M. Rouxii*. Für *Rh. tonkinensis* (*Amylomyces γ*) ist nach ausführlichen genauen Feststellungen Nikolski's (1) Inulin das best nährende Substrat, es steht über Dextrose und Maltose; minder geeignet sind als Kohlenstoffquellen Rohrzucker, Galactose, Lävulose, Raffinose, Dextrin, Milchzucker in dieser Reihenfolge; trotz minimaler Ernte (ca. 5—8 mg) auf Milchzuckerlösung wurde eigenartigerweise auch von dieser Zuckerart eine beträchtliche Menge (über 1 g) durch den Pilz verbraucht, am schnellsten wurde die Maltose zersetzt.

Teichert (2) erzielte mit *M. Mucedo* bei Kultur auf Lösungen verschiedener Zucker das höchste Erntegewicht (6,97 g) und selbst noch auf Milchzucker eine ansehnliche Menge Pilzsubstanz (2,42 g Trockengewicht). Demgegenüber stand in Fleroff's (1) Versuchen mit demselben Pilz der Milchzucker erst als vierter hinter Lävulose (bestnährend), Dextrose, Maltose; Inulin war hier die ungünstigste Kohlenstoffquelle. Kurze Angaben über das Verhalten von *M. javanicus, M. Rouxii, M. dubius, Rhizopus Oryzae* auf Lösungen von Rohrzucker, Malzzucker und Milchzucker findet man auch bei Wehmer (8); Milchzucker erwies sich hier neben Mineralsalzen durchweg als fast wertloser Nährstoff, Rohrzucker auch für *M. Rouxii*, indes Maltose für alle günstig war. Soweit die Jodoformreaktion da maßgebend ist, wurde hier übrigens in fast allen Fällen (auch bei Fehlen von sichtbaren Gärungserscheinungen) Alkohol nachgewiesen, ein Punkt, der genaueren Verfolg verdiente. Went und Prinsen Geerligs (1) konstatierten allerdings keine Alkoholbildung bei *Rh. Oryzae*. Ueber andere Arten vergleiche man auch die Angaben bei E. Chr. Hansen (1). Angeführt sei hier immerhin die im Gegensatz zu den sonstigen Angaben stehende Beobachtung Schäffer's (1) aus dem Jahre 1900, derzufolge *M. Mucedo* wie *Rhizopus nigricans* direkt Rohrzucker invertieren sollen, diese gleiche Wirkung übrigens auch den durch Zerreiben hergestellten Auszügen von *M. spinosus* (und *M. racemosus*) zukommt. Daß *M. corymbifer* (*Lichtheimia corymbifera*) Invertin enthält, gab Emmerling (2) kurz an. Nach neueren Mitteilungen Saito's (3) wird Rohrzucker noch von zwei weiteren *Rhizopus*-Arten (*Rh. japonicus var. angulosporus* und *Rh. Tamari*) vergoren.

Von zuckerspaltenden Enzymen ist nach dem Mitgeteilten, und insofern wir aus der Vergärung der Zuckerart einen Schluß auf Anwesenheit des betreffenden Enzyms ziehen dürfen, bei den Mucoreen jedenfalls Maltase allgemein verbreitet, Invertase findet sich nur in Ausnahmefällen, Lactase dagegen fehlt allgemein. In bestimmten Fällen sind noch Trehalase, Raffinase, Melibiase nachgewiesen. Eine Uebersicht gibt die tabellarische Zusammenstellung am Schluß dieses Kapitels. Es darf allerdings nicht verhehlt werden, daß die Studien über alle diese meist nur supponierten Enzyme noch der Vertiefung bedürfen, also noch keineswegs als abgeschlossen zu betrachten sind.

Ueber das Verhältnis von Alkohol zu Kohlensäure bei der

Mucorgärung existieren nur einige frühere Ermittlungen. Im allgemeinen überwiegt die Kohlensäure um so mehr, je reichlicher Sauerstoff zutreten konnte, also je weniger vollständig der Luftabschluß war. Als Mittel aus 9 Bestimmungen fand Fitz (2) für *M. racemosus* Alkohol zu Kohlensäure im Verhältnis von 100 : 123,1, d. h. also einen beträchtlichen Anteil Atmungskohlensäure; ähnliche Zahlen lieferten auch die Bestimmungen von Gayon (1) für *M. circinelloides.*

An sonstigen Stoffen sind in der Gärflüssigkeit neben der anscheinend sehr verbreiteten Oxalsäure auch Glycerin, Bernsteinsäure und Aldehyd nachgewiesen worden, und zwar die letzteren drei bei *M. circinelloides* durch Gayon (1), nur die zwei letzten bei *M. racemosus* durch Fitz (3), die beiden ersten (Glycerin. Bernsteinsäure) dagegen von Emmerling (1) bei demselben Pilz. Offenbar ist die Reihe solcher Nebenprodukte damit nicht erschöpft, man wird hier mit einigem Recht alle diejenigen Substanzen erwarten, welche bei der Hefegärung (s. d. 18. Kap.) auftreten; man vergleiche auch § 111.

Alkoholzahlen liegen endlich für eine ganze Reihe von Species vor. Leider zeigen sie schon für dieselbe Species wenig Uebereinstimmung. Die beträchtlichen Abweichungen mögen bald auf die Art der mehr oder minder geeigneten Zusammensetzung der Gärflüssigkeit, bald auf Verschiedenheit der (wenn auch mit gleichem Namen bezeichneten) Pilze, bald auch auf fehlerhafte Bestimmung oder sonstiges zurückzuführen sein. Die Temperatur kann schließlich nur die Schnelligkeit der Reaktion beeinflussen, ohne daß höhere Wärmegrade sonst notwendig begünstigend sind. Dabei ist die Gärdauer aus nicht ganz klar ersichtlichem Grunde oft auf Monate und selbst Jahre ausgedehnt, wodurch in nicht streng abgeschlossenen Versuchen jedenfalls die Gefahr von Verlusten durch Verdunstung entsteht. Selbst bei Zimmertemperatur ist nach eignen Versuchen bei *M. javanicus* wie *M. racemosus* die Hauptgärung bei Luftabschluß schon nach ca. 10 Tagen, bei Luftzutritt aber schon in der ersten Woche vollendet, nach 3—4 Wochen ist auch die Nachgärung bei Luftabschluß schon sehr schwach geworden und der größere Teil des Zuckers zersetzt. Ueberhaupt vollzieht sich unter sonst geeigneten Bedingungen bei Sauerstoffgegenwart und gewöhnlichen Wärmegraden der Hauptumsatz (Zersetzung von zwei Dritteln des Zuckers) bereits in den ersten Tagen; vgl. Wehmer (3). Die Mucorgärung schlechthin zeigt also auch darin keinen prinzipiellen Unterschied gegen die Saccharomycetengärung. Mehr als ca. 3—5 Proz. Alkohol scheinen jedoch die bisher genauer untersuchten Species nicht zu bilden; in der Literatur fehlt leider nicht selten Genaueres über die Art der Alkoholbestimmung. Werfen wir hiernach einen Blick auf die früheren Untersuchungsergebnisse. Wo nicht anders bemerkt ist, sind stets Gewichtsprozente zu verstehen.

Fitz (2), der die Bildung von Alkohol bei der Mucorgärung zuerst bewies, auch die Natur des Gases als Kohlensäure sicherstellte, erhielt bei seinem (anfänglich als *M. Mucedo*) später als *M. racemosus* bezeichneten Pilz aus Rohrzucker mit Mineralsalzen gegen 3 Proz. Alkohol, ein Teil des zu 7 Proz. gelösten Zuckers blieb selbst bei längerer Versuchsdauer (Monate) stets unvergoren. Auch in Most wurden in 6 Versuchen bei 25—30 ° nach anderthalb Monaten nur zwischen 2,3 und 2,7 Proz. Alkohol erhalten; der echte *M. Mucedo* lieferte demselben in Most mit 12 Proz. Zucker binnen 7 Wochen nur 0,8 Proz. Alkohol.

Frühere von ihm erhaltene Zahlen (3,5—4 Proz.) für *M. racemosus* hält Fitz dagegen wohl mit Recht für zu hoch.

Pasteur (1) erhielt von seinem *M. racemosus* im Jahre 1876 in Bierwürze bei ca. zweijähriger Versuchsdauer 3,3 und 3,4 Proz. Alkohol, von *M. Mucedo* ebenso nach 14 Monaten 1,6 Proz. (Zimmertemperatur).

Brefeld (1) fand im Jahre 1876 für *M. racemosus* (bei höherer Temperatur) bis 5,5 Proz., für *M. Mucedo* bis 2,6 Proz., für *Rhizopus nigricans* 1,3 Proz. bei längerer nicht genauer angegebener Zeitdauer, in Nährlösung. Diese Zahlen dürften wohl als zu hoch gelten.

Gayon (1) ermittelte im Jahre 1878 für *M. circinelloides* (Kugelhefe) in fünf Versuchen mit Würze und Most ziemlich gleichmäßig nach 26 Tagen bis 7 Monaten 4,1—4,7 Proz., als Maximum aus Dextrose 5,2 und 5,5 Proz., aus Lävulose 5,5 Proz.; die Vergärung blieb meist mit ansehnlichem Zuckerrest unvollständig. Nicht ohne Interesse ist hier der Vergleich mit einer Bierhefe: es ergaben sich bei Vergärung von 150 ccm Würze in 19 Tagen (bei 35 °) bezw. 32 Tagen (bei 15 °):

	Mucor circinelloides		Bierhefe	
	a (19 Tage)	b (32 Tage)	a (19 Tage)	b (32 Tage)
Alkohol	4,069 g	4,883 g	6,079 g	7,033 g
Unvergorener Zucker . .	4,96 Proz.	4,13 Proz.	1,14 Proz.	0,98 Proz.
Unvergorene Dextrine . .	2,09 „	1,34 „	2,24 „	3,06 „
Anfangs vorhand. Zucker .	7,17 „	—	7,17 „	—
„ „ Dextrine	8,14 „	—	8,14 „	—

Bei höherer Gärtemperatur wird also, wie vorauszusehen, lediglich die Alkoholgrenze früher erreicht. *M. spinosus* lieferte Gayon nur 1,5 bis 2 Proz. Alkohol (in Würze). Da beide Pilze kein Invertin ausschieden, vermochten sie Rohrzucker nicht zu vergären — die positiven Versuche mit der Kugelhefe des *M. circinelloides* erklären sich wohl durch Versuchsfehler —, doch fand Wachstum auch auf dem nicht-invertierten Zucker statt. Ebenso sollen sich *M. Mucedo* und *Rhizopus nigricans* verhalten. Die Gärprodukte des *M. circinelloides* waren die gleichen wie bei Bierhefe, nur das Verhältnis variierte etwas (mehr Gas); neben Spuren von Aldehyd wurden auch Glycerin und Bernsteinsäure (2,07: 0,92 Proz.) ermittelt. Nicht zu übersehen ist freilich, daß Gayon's Gärungen nicht immer rein waren (Infektion durch Torula und Bakterien).

Gayon und Dubourg (1) fanden im Jahre 1887 bei *M. alternans* in Würze binnen 40 Tagen 6,5 Proz. (eine verglichene Hefe lieferte nur 5,2 Proz.), in Dextrinlösung 4,2 Proz., in entgeistetem Bier 4,5 Proz. Nach Abtreiben des Alkohols und Neuaussaat setzte die Gärung in der Würze von neuem ein unter Bildung weiterer 3,4 Proz. Alkohol; offenbar bezeichnen jene Zahlen hier also die wirklichen Alkoholgrenzen. Ein *M. racemosus* lieferte denselben Forschern in Dextrinlösung binnen 20 Tagen 2,1 Proz. Alkohol.

E. Chr. Hansen (1) gibt im Jahre 1888 für *M. racemosus* in Würze bei Zimmertemperatur nach 12 Monaten 7 Proz. Alkohol an, für *M. Mucedo* ebenso nach 15 Tagen bei 23 ° C 0,5 Proz., nach 6 Monaten (Zimmertemperatur) 3 Proz., für *M. spinosus* (= *M. plumbeus*) nach $6\frac{1}{2}$ Monaten 5,4 Proz., dagegen in Maltose nach 8 Monaten 3,4 Proz., für *M. erectus* wiederum in Würze nach $2\frac{1}{2}$ Monaten sogar 8 Proz. (bei Zimmertemperatur), bei 25 ° dagegen 7 Proz. Das sind die höchst gefundenen Zahlen überhaupt, sie weichen merklich von den sonst für einzelne dieser

Pilze gefundenen ab, im Gegensatz zu den anderen sind diese Zahlen jedoch Volumprozente, also entsprechend zu verkleinern.

Emmerling (1) fand im Jahre 1898 für *M. racemosus* in Rohrzuckerlösung mit Mineralsalzen unter Wasserstoffatmosphäre binnen 3—4 Wochen bei 25° nur 1,46 Proz. Alkohol, daneben 0,31 g Bernsteinsäure und 1,83 g Glycerin; die Mengenverhältnisse waren ungefähr die gleichen wie bei der Saccharomycetengärung, an Glycerin 8,3 Proz. und an Bernsteinsäure 1,4 Proz. des Alkohols aus 100 g Zucker.

Calmette (1) fand im Jahre 1892 bei *M. Rouxii* in 6 Tagen an Alkohol 2,4 Prozent.

Sanguineti (1) ermittelte im Jahre 1897 in Würze und Brennereimaische bei 30-tägiger Gärdauer durch *M. alternans* 3.17 und 3,33 Proz., durch *M. Rouxii* 3,8 und 3 Proz. Alkohol.

Henneberg (1) gab für *Rhizopus japonicus* („*Amylomyces β*“) in Getreidemaischen nach ca. 2 Monaten 3,6—4,8 Proz., in Maismaische 4 Proz., nach 14 Tagen an, fand aber in minder günstig zusammengesetzten Gärflüssigkeiten meist erheblich weniger, so in Stärkekleister mit Hefenwasser 3,3 Proz. (10 Tage), in Kartoffelmaische nur 0,5—2,7 Prozent.

Sitnikoff und Rommel (1) bestimmten bei *Rhizopus tonkinensis* („*Amylomyces γ*“) 1,5 Proz., bei *M. Rouxii* unter gleichen Bedingungen dagegen 3,2—3,4 Proz. Alkohol. Chrzaszcz (1) fand für letzteren im Jahre 1901 in zwei Versuchen nur 0.45 und 0.98 Proz. in 10 bezw. 20 Tagen (Würze und Dextrose, 35° und 40°), für *Rhizopus Cambodja* 0,49 und 1,06 Proz. (sonst wie vorher). Diese Zahlen sind nach den obigen drei Bestimmungen für *M. Rouxii* offenbar mit einem Fehler behaftet.

Saito (1) gab im Jahre 1904 für *Rh. chinensis* in Würze bei zehntägiger Versuchsdauer (37°) 2 Proz. an.

Wehmer (1) ermittelte im Jahre 1905 für *M. racemosus* in Würze bei 28-tägiger Versuchsdauer bis 2,51 Proz., für *M. javanicus* in Würze bei 7- bis 22-tägiger Gärdauer im Mittel 4—5 Proz. (im Maximum 6,6 Proz.) Alkohol (15—20°); hier Volum-Prozente.

Hiernach ergaben sich für die einzelnen Arten folgende Zahlen (Gewichtsprozente): 1. *Mucor racemosus:* Fitz 2.3—2.7 Proz. (3,5—4 Proz. nach früherer Angabe) in $1^1/_2$ Monaten (Most, Rohrzucker), Pasteur 3,3—3,4 Proz. in $2-2^1/_2$ Jahren (Würze), Brefeld 4,5—5.5 Proz. in $1^1/_2$—2 Monaten (Nährlösung), Gayon und Dubourg 2,1 Proz. in 20 Tagen (Dextrinlösung), Emmerling 1,46 Proz. in 3—4 Wochen (Rohrzucker mit Nährsalzen), E. Chr. Hansen 7 Proz. in 12 Monaten (Würze, hier Vol.-Proz.!), Wehmer bis 2,5 Proz. in 28 Tagen (Würze). — 2. *M. Mucedo:* Fitz 0,8 Proz. in 7 Wochen (Most), Pasteur 1,8 Proz. in 14 Wochen, Brefeld 2,6 Proz. (Zeit unbestimmt, Nährlösung), Hansen 3 Proz. in 6 Monaten (Vol.-Proz.!). — 3. *M. alternans:* Sanguineti 3,17—3,33 Proz. in 30 Tagen (Würze, Maische), Gayon und Dubourg 6.5 Proz. in 40 Tagen (Würze). — 4. *M. circinelloides:* Gayon 4,1—4,7 Proz. in 26 Tagen bis 7 Monaten (Würze und Most). — 5. *M. spinosus* (= *M. plumbeus*): Gayon 1.5—2 Proz. (Würze), Hansen 5,4 Proz. in $6^1/_2$ Monaten (Würze), Hansen 3,4 (Vol.-Proz.) in 8 Monaten (Maltose). — 6. *M. Rouxii:* Calmette 2,4 Proz., Sanguineti 3—3,8 Proz. in 30 Tagen, Sitnikoff und Rommel 3.2—3,4 Proz., Chrzaszcz 0,45 und 0.95 Proz. (Würze, Dextrose) in 10 und 20 Tagen. — 7. *M. erectus:* Hansen 8 Vol.-Proz. in $2^1/_2$ Monaten (Würze). — 8. *M. javanicus:* Wehmer 4—5 Vol.-Proz. (bis 6,6 Proz.) in 7—22 Tagen (Würze). — 9. *Rhizopus nigricans:* Brefeld 1.3 Proz. (nach längerer Zeit). — 10. *Rh. japonicus* (*Amylomyces β*): Henneberg bis

4.8 Proz. in 2 Monaten (Getreidemaische), SITNIKOFF und ROMMEL 1,5 Proz. — 11. *Rh. Cambodja:* CHRZASZCZ 0,5—1 Proz. in 10 und 20 Tagen (Würze, Dextrin). — 12. *Rh. tonkinensis* (*Amylomyces γ*): SITNIKOFF und ROMMEL 1,5 Proz. — 13. *Rh. chinensis*: SAITO 2 Proz. nach 10 Tagen (Würze).

Als mittlere Grenzzahlen (Gew.-Proz.) darf man, von einzelnen besonders hohen Werten absehend, daraus für die einzelnen Species wohl ungefähr folgende ableiten: *Mucor Mucedo:* 1 Proz. (?), *M. plumbeus:* ca. 2 Proz., *M. racemosus:* 2—3 Proz., *M. alternans:* 3—3,5 Proz., *M. Rouxii:* 3—4 Proz., *M. javanicus:* 4 Proz., *M. circinelloides:* 4—5 Proz., *Rhizopus nigricans:* 1 Proz. (?), *Rh. chinensis:* 1—2 Proz., *Rh. tonkinensis:* 1—2 Proz. (?), *Rh. japonicus:* 4—5 Proz. (?).

Am wenigsten leistungsfähig ist anscheinend *M. Mucedo*, vielleicht ist die Grenzzahl mit 1 Proz. noch zu hoch angenommen. KOSTYTSCHEW's (2) Bestimmungen ergaben freilich *Rh. nigricans* als untenanstehend. Nach einem vergleichenden Gärversuch im Gärungs-Saccharometer mit verdünnter Bierwürze (20 ° C) stellt sich die Reihenfolge für sechs von diesen Species nach WEHMER (1) so: *M. Mucedo, Rhizopus nigricans, Rh. tonkinensis, M. plumbeus, M. Rouxii, M. javanicus;* der erstgenannte hatte auch nach 30 Tagen noch kein Gas angesammelt, während *M. javanicus* bereits nach 6 Tagen den geschlossenen Saccharometer-Schenkel gefüllt hatte:

Species	Gasansammlung im Gärungs-Saccharometer:			
	nach 6 Tagen	nach 14 Tagen	nach 20 Tagen	nach 30 Tagen
M. Mucedo	0	0	0	0
Rh. nigricans	0	Spur ($^1/_{20}$)	$^1/_4$ gefüllt	$^1/_3$ gefüllt
Rh. tonkinensis	0	$^2/_3$ gefüllt	überfüllt	überfüllt
M. plumbeus	Spur	$^3/_4$ gefüllt	„	„
M. Rouxii	$^1/_5$ gefüllt	überfüllt	„	„
M. javanicus	ganz gefüllt	„	„	„

Auch hieraus ergeben sich *M. javanicus* und *M. Rouxii* als obenanstehend, zweifelsohne sind also die für letzteren von CHRZASZCZ (1) gegebenen oben mitgeteilten Zahlen zur Charakterisierung des Gärvermögens dieses Pilzes wertlos. Gegenüber den anderen ist die Schnelligkeit im Einsetzen der Gärung bei *M. javanicus* bemerkenswert. Die beträchtlichen Schwankungen der bisherigen Alkoholzahlen selbst für die gleiche Art machen neuere Ermittelungen nach dieser Seite hin übrigens sehr erwünscht.

§ 110. Verzuckernde Wirkung.

An die bereits auf S. 514 besprochene Zuckerspaltung schließt sich unmittelbar die Zuckerbildung durch unsere Mucoreen an; auch hier handelt es sich um einen durch Enzyme bewirkten Abbau, ihm unterliegen die Kohlenhydrate der Stärkegruppe (Polysaccharide), das Produkt sind Di- und Monosaccharide, also die gewöhnlichen Zuckerarten. Nicht wenige Mucoreen führen den Abbau der Stärke herunter bis zu dem dann der Alkoholgärung anheimfallenden Traubenzucker durch, diese Reaktion bedingt deren technische Bedeutung, und lediglich diese

rechtfertigt die Abhandlung der diastatischen Wirkung in einem besonderen Paragraphen.

Beiläufig sei der mit der Stärke in die gleiche Gruppe gehörigen Cellulose, Inulin, Glycogen gedacht, das Dextrin bedarf als bei der Stärkehydrolyse auftretend keiner besonderen Erwähnung. Nur zwei dieser Verbindungen (Inulin, Glycogen) werden von einigen Species in alsbald dem Verbrauch unterliegende Zuckerarten umgesetzt, über die betreffenden Enzyme ist jedoch wenig bekannt; KEAN (1) berichtete zwar im Jahre 1890 auch über eine aus *Rhizopus nigricans* dargestellte Cytase; ebenso wirken ostasiatische *Rhizopus*-Arten, wie *Rh. Oryzae* und *Rh. Tamari*, nach PRINSEN GEERLIGS (1) und SAITO (3) bei der Aufschließung gewisser Nahrungsmittel (Bohnen, Erdnußkuchen) Zellwände auflösend. In diesen Fällen liegt aber echte Cellulose nicht vor. *Rhizopus nigricans* vermag nach J. BEHRENS (2) diese jedenfalls auch nicht aufzulösen; s. auch MIYOSHI (1). Dagegen löste er, wie *M. hiemalis*, die Mittellamellensubstanz (Calciumpektinat) aus verschiedenen Pflanzen unter Hydrolyse zu Pentosen, worauf übrigens auch die Tätigkeit dieser Pilze bei der Hanfrotte (s. Bd. III, S. 280) beruht. Einzelne Angaben über das Inulin sind bereits im vorigen Paragraphen gemacht worden, bei der Vergärung desselben (durch *Rh. japonicus*, aber nicht durch *Rh. tonkinensis*) dürfte also Inulase als zuvor in Lävulose umbildendes Enzym mitspielen, *M. racemosus* war dazu nach FITZ (1) nicht imstande, ob nicht auch — entgegen SITNIKOFF und ROMMEL — der *M. Rouxii*, der auf seinen Lösungen besonders gut gedeiht, wäre einmal genauer nachzuprüfen. Bezüglich des Dextrins stehen die Angaben von FITZ nicht mit denen von GAYON und DUBOURG (1), welche durch *M. racemosus* binnen 20 Tagen 2,1 Proz. Alkohol in seiner Lösung entstehen sahen, in Einklang; die Art des Dextrins spricht dabei wohl mit. Nach letzteren wird es auch durch *M. alternans* vergoren, also vorher verzuckert.

Die ausgesprochene Vorliebe mancher Mucoreen für stärkereiche Substrate (gekochter Reis, ebensolche Kartoffeln, Mehl von Cerealien, Kleister u. a.) verdächtigt solche Species ohne weiteres als Diastasebildner, erst durch diese Eigenschaft gewinnt das Substrat für sie seine Bedeutung. Ein besonderer Nachweis liegt in dieser Richtung zumal für technische Arten (*M. Rouxii*, *Rhizopus Oryzae*, *Chlamydomucor Oryzae*, *Rh. japonicus*, *Rh. tonkinensis* u. a.) vor, aber auch andere (*M. alternans*, *M. hiemalis*, *Rhizopus nigricans*) stehen da nicht zurück: für mehrere ist die Tatsache selbst nur kurz angegeben (*M. Praini*, *M. hiemalis*, *Rh. chinensis*, *Rh. Tritici*, *Rh. oligosporus* u. a.), obschon wenigstens die praktisch genutzten Reismehlverzuckerer („Mehlpilze" könnte man sie treffend benennen) unter ihnen fraglos ausgesprochen amylolytisch wirken.

Während die rohe Empirie das Vermögen solcher Pilze seit ältesten Zeiten ausnutzt, ist die Geschichte seiner Kenntnis nicht alt, die ersten wissenschaftlichen Beobachtungen darüber sind erst neueren Datums, haben sich in diesen 20 Jahren aber außerordentlich erweitert. Die erste Mitteilung über Verzuckerung durch einen *Mucor* machten im Jahre 1887 GAYON und DUBOURG (1), ihre Versuchspilze waren *M. circinelloides*, *M. alternans*, auch eine „Varietät" des *M. racemosus*. Stärke oder Dextrin sollten diese drei Pilze durch eine ausgeschiedene Diastase in Dextrose (*M. circinelloides*) oder Maltose (*M. alternans*) umwandeln und die Zucker dann vergären. Auffällig an den Angaben

unserer Forscher ist freilich die Behauptung, daß nicht das Mycel, sondern nur die entstehende Hefeform (Kugelhefe) jene Diastase ausscheidet, man wird das schon mit Rücksicht auf das oben über die Kugelhefe Gesagte direkt bezweifeln dürfen und nicht ganz mit Unrecht die Frage aufwerfen, ob da nicht auch anderes mitspielte (bakterielle Infektion). Das Mitspielen solcher (Bakterien und eine „Torula") hatte für frühere Gärversuche (1877) speziell GAYON (1) auch direkt zugegeben, sie aber für nicht wesentlich erklärt. Wir lassen das wie auch die Beobachtung, derzufolge *M. racemosus* binnen 3—4 Wochen nahezu 3 Proz. des Dextrins verarbeitete, dahingestellt und registrieren nur die Angabe, daß die wirksame Diastase im wässrigen Auszuge durch Alkohol fällbar war, bei 70—75 ° zerstört wurde, übrigens bei 55 ° ungleich lebhafter wirkte als bei niedrigerer Temperatur. Es würde das alles schließlich auch für eine bakterielle Diastase gelten können. Durch *M. alternans* wurden innerhalb 5 Wochen mehr als 5 Proz. Dextrin verzuckert.

Bald darauf (1892) isolierte CALMETTE (1) aus der „Chinesischen Hefe" (s. Bd. V, S. 320) den als *Amylomyces Rouxii* (= *Mucor Rouxii*) bezeichneten ersten ostasiatischen Verzuckerungspilz, dessen diastatische Wirkung zumal gut bei submerser Vegetation in Stärkekleister beobachtet wurde: binnen 4 Tagen setzte er da mehr als die Hälfte (64 Proz.) der Stärke in Zucker um. Die aus dem Mycel in destilliertes Wasser übertretende „Amylase" ging durch Chamberland-Filter nicht hindurch, wurde durch Gifte (1 Proz. Karbolsäure, 0,1 Proz. Kupfervitriol) wenig beeinträchtigt, jedoch bei Erhitzen auf 72 ° zerstört; bei 35—38 ° war die Wirkung des Pilzes am schnellsten. Die entstehende Zuckerart war Maltose oder ein Gemenge derselben mit Dextrose, nach späterer Angabe von BOIDIN und ROLANTS (1) aus dem Jahre 1897 fanden diese jedoch nur Dextrose. Unter der Annahme, daß der Pilz auch Maltase erzeugt, ist das mit CALMETTE's Feststellung wohl vereinbar. SANGUINETI (1) verglich die diastatische Wirkung dieser Art mit der von *M. alternans* und *Aspergillus Oryzae*, dem Reisschimmel der Japaner (s. S. 203): letzterer wirkte am trägsten, *M. alternans* aber besser als *M. Rouxii* auf das benutzte Dextrin.

Als nächste speziellere Arbeit über Mucoreenverzuckerung erschien im Jahre 1895 die Mitteilung von WENT und PRINSEN GEERLIGS (1) über die javanischen *Rhizopus Oryzae* und *Chlamydomucor Oryzae*, welche zumal Dextrine, Stärke jedoch nur teilweise (mit Ausnahme der Granulose) angreifen. Der resultierende Zucker war auch hier Dextrose. Besonders die zweitgenannte Art (wohl eine sporenlose Varietät, s. S. 495) wirkte lebhaft und erzeugte davon in 3 Tagen bereits ca. 12 Proz., indes *Rh. Oryzae* in 4—6 Tagen nur ca. 10 Proz. Zucker in der Nährflüssigkeit bildete. Es mag da der schnellere Verbrauch infolge reichlicher Sporenbildung mitspielen. Die Wirkung war an eine noch nicht genauer untersuchte Diastase gebunden. Merklich verschieden war aber das Verhalten der einzelnen Stärkearten gegenüber der Verzuckerungswirkung.

Mancherlei hier Raummangels halber nicht auszuführende Einzelheiten sind auch von den bald darauf durch COLLETTE und BOIDIN (1) bekannt gewordenen beiden weiteren fremden Mehlpilzen beschrieben, welche bezüglich Leistungsfähigkeit den *M. Rouxii* noch übertreffen (*Rhizopus tonkinensis* und *Rh. japonicus*). Eingehendere Mitteilungen über das Verzuckerungsvermögen der letzteren Art liegen von HENNEBERG (1)

aus dem Jahre 1902 vor. Die hier entstehende Zuckerart — scheinbar Maltose — ist noch nicht sichergestellt, die Diastase diosmiert schwer in die Kulturflüssigkeit, doch verzuckerte das zerriebene trockene Mycel einen zweiprozentigen Stärkekleister bei 39° binnen 24 Stunden, schneller 5 noch bei 50°, zehnprozentiger Kleister wurde nur träge, unverkleisterte Kartoffelstärke überhaupt nicht angegriffen. Es war für die Wirkung gleich, ob das Mycel submers oder oberflächlich gewachsen ist, einen gewissen Einfluß hatte jedoch die Art der Nährlösung auf den Diastasegehalt der Hyphen; von dem gebildeten Zucker vergor der Pilz einen 10 kleinen Anteil auf Alkohol (s. S. 518). In seinem Verhalten gegenüber Dextrin und Stärkekleister stimmt *Rh. tonkinensis* damit fast ganz überein; s. darüber auch Sitnikoff und Rommel (1). Genauere Einzelheiten über die erst neuerdings beschriebenen *M. Praini*, *Rhizopus oligosporus*, *Rh. chinensis*, *Rh. Tritici* hinsichtlich Verzuckerungsvermögen, Art der Diastase 15 und des gebildeten Zuckers werden in den Arbeiten von Nechitch (1) und Saito (1 u. 2) noch nicht angegeben; im ganzen kennen wir also — um kurz zu resumieren — eine Vielzahl von Verzuckerungspilzen, doch wenig Genaueres über Art und Wirkung ihrer noch zu isolierenden Diastasen. Nur für *Rhizopus nigricans* erwähnt J. Behrens (1) kurz, 20 daß derselbe auf Stärke anscheinend ein glucaseartiges Enzym bildet: der entstandene Zucker reducierte Kupferacetatlösung.

§ 111. Sonstige Wirkungen.

Es kann nicht Zweck dieses Kapitels sein, hier eine umfassende chemische Physiologie der Mucoreen, soweit sie in den zwei vorherigen 25 Paragraphen noch nicht berührt ist, zu geben und alles wieder aufzuzählen, das bereits an anderen Stellen des Handbuches bei Besprechung der chemischen Wirkungen einzelner beliebter Versuchspilze (*M. Mucedo*, *M. racemosus*, *Rhizopus nigricans*) mitgeteilt ist. Wir beschränken uns auf Zusammenfügung bestimmter, in der Literatur verstreuter Beob-30 achtungen, die aus diesem oder jenem Grunde, unter anderem auch für die Speciesunterscheidung, von Interesse sind, zu einem geschlossenen Bilde. Leider liegen da Feststellungen in einem größeren, wünschenswerten Umfange noch nicht vor, so ist z. B. das Verhalten der verschiedenen Species gegen Eiweiß, Gelatine, Fett, die Spaltung von Gly-35 cosiden, das Säuerungsvermögen, Bildung toxischer Substanzen u. a. bislang nur vereinzelt oder überhaupt nicht genauer untersucht.

Seit langem ist die Tatsache bekannt, daß verschiedene *Mucor*- und *Rhizopus*-Arten ihre zuckerhaltige Kulturflüssigkeit ansäuern, also organische Säure in freiem Zustande abspalten können. Natur der Säure, 40 Entstehungsbedingungen, speziell auch der Wärmeeinfluß, das Verhalten der Pilze gegen derartige Säuren überhaupt und anderes ist aber, von wenigen Ausnahmen abgesehen, bislang nicht näher verfolgt. Die Ansäuerung selbst ist unter gewöhnlichen Verhältnissen nur schwach, ausgesprochenes Säuerungsvermögen kommt den Vertretern dieser Gruppe 45 anscheinend nicht zu, freilich wäre noch zu zeigen, ob es nicht durch experimentelle Eingriffe gesteigert werden kann; die bisherigen Feststellungen sind meist beiläufige. So betrug nach Brefeld (1) die Acidität von 25 ccm einer durch *M. racemosus* vergorenen Flüssigkeit 0,5 ccm Normallauge, bei *M. Mucedo* und *Rhizopus nigricans* das Doppelte. Pasteur (1) 50 fand in seinen lange dauernden Gärversuchen mit *M. racemosus* 0,11 g

und 0,12 g Säure (auf Schwefelsäure berechnet) in 100 ccm Flüssigkeit. Möglicherweise spielt in diesen Fällen Oxalsäure (s. unten) neben Bernsteinsäure mit, wenigstens gelingt es in Kulturen von *Rhizopus* durch Zusatz von Kalksalzen, diese in kalkfreien Kulturflüssigkeiten nicht vorhandene, also vermutlich wieder zersetzte Säure festzulegen, 5 wie WEHMER (6) zeigte, auch ist sie bei diesem Pilz in Peptonkulturen als Salz (Ammoniumsalz) vorhanden. Festlegung der gleichwie bei *Aspergillus niger* intermediär gegebenen Oxalsäure kann natürlich durch irgend eine disponibel werdende Basis oder ein säurebindendes Salz erfolgen, nur in derartiger Kulturflüssigkeit wird man sie erwarten dürfen. Dem- 10 entsprechend fand auch KOSTYTSCHEW (1) die Säure reichlich in den Kulturen mit weinsaurem Ammon, spärlich in solchen mit Zucker; der mehr oder minder erhebliche Luftabschluß hat für die Säureentstehung wohl keine Bedeutung; natürlich muß soviel Sauerstoff zutreten, daß der Pilz überhaupt gedeihen kann (s. bei *Aspergillus niger* auf S. 243). Stets 15 scheint es sich, wie auch BIOURGE (1) für *M. racemosus* angab, bei Mucoreen um fixe Säuren zu handeln. Die von *M. Rouxii* gebildete Säure hielt CALMETTE (1) gleichfalls für Oxalsäure, EIJKMAN (1) wie CHRZASZCZ (1) für Milchsäure, ohne daß Beweise gegeben sind; jedenfalls ist Milchsäure sehr unwahrscheinlich, da diese Säure bei Mycel- 20 pilzen bislang noch nie beobachtet worden ist, doch scheint CALMETTE's Angabe richtig zu sein. *M. alternans* ließ nach SANGUINETI (1) die Acidität des vergorenen stärkehaltigen Substrats von 0,127 auf 0,980 g (berechnet auf Schwefelsäure) steigen, *M. Rouxii* auf 0,600 g, noch stärker war die Ansäuerung zumal durch letzteren in Würze und Maische, 25 wo die Zunahme pro Liter ca. 1 g betrug. Da übrigens dieser Pilz nach VUILLEMIN (2) stark mit Kalkoxalatkristallen inkrustiert sein kann — ähnlich auch andere *Rhizopus*-Arten — so ist gegen die Annahme von Oxalsäure kaum etwas einzuwenden. Bei *M. piriformis* handelt es sich nach WEHMER (7) um Citronensäure; Kulturflüssigkeiten dieses 30 Pilzes zeigten bei Kreidezusatz Aufbrausen, was auch das Vorhandensein freier Säure (nicht etwa bloß lackmusrötender Salze) beweist. *Rhizopus Oryzae* und *Chlamydomucor Oryzae*, welche nach WENT und PRINSEN GEERLIGS (1) Milch unter Ansäuerung koagulieren, erzeugten nach 6 Tagen eine Acidität von 0,1 Proz. (auf Milchsäure berechnet). Die Ansäuerung 35 von Würze durch *M. Mucedo* und *M. racemosus* belief sich nach GRAF (1) binnen 28—35 Tagen auf 5 bezw. 8 ccm Zehntelnormal-Barytlauge, bei *Rhizopus chinensis* und *Rh. Tritici* nach SAITO (1) auf 42 bezw. 39,9 ccm Zehntelnormal-Natronlauge für 100 ccm Kulturlösung bei 35° in 10 Tagen. Auch in Kulturen anderer Species (*M. javanicus*, *M. hie-* 40 *malis*) läßt sich Aciditätszunahme feststellen. Daß empfindliche Species durch die von ihnen selbst erzeugte Säure geschädigt werden können, ist nicht weiter auffällig; es würde ganz den für Essig- und Milchsäure bekannten Beobachtungen bei den bezüglichen Bakterienarten entsprechen. 45

Wenn auch der bestimmte Nachweis dafür, daß abgespaltene freie Säure unter entsprechenden Bedingungen wieder verschwinden kann, bislang fehlt, so sind doch die Feststellungen TEICHERT's (2) in diesem Sinne deutbar; nach 20—25 Tagen fand dieser zweiprozentige Zuckerlösungen durch *M. Mucedo* durchweg merklich alkalisch geworden; aller- 50 dings fragt sich, ob hier überhaupt vorher freie Säure vorhanden war.

Auf die physiologisch beachtenswerte Tatsache, daß unsere Mucoreen hiernach den Zucker gutenteils auf Alkohol und Oxalsäure

verarbeiten, aber nur letztere weiter zu zersetzen scheinen, ist bereits auf S. 513 kurz hingewiesen worden; dem würde auch eine Gärungstheorie voraussichtlich Rechnung zu tragen haben.

Mit dieser Säurebildung steht offenbar die für viele Arten bekannte Ausscheidung von Körnchen oder Nädelchen eines Kalksalzes in Zusammenhang, das gewöhnlich als Calciumoxalat angegeben wird, solches auch wohl oft ist, und bei *M. Mucedo, M. circinelloides, M. alternans, M. plumbeus* (= *M. spinosus*), *M. Rouxii, M. racemosus, Rhizopus oligosporus, Rh. Tritici* u. a. zumal das Sporangium inkrustiert, anscheinend bisweilen aber auch auf die Sporen übergreifen kann (*M. plumbeus*). Diese Oxalatbildung muß notwendig unter Einfluß der Ernährungsbedingungen stehen, also in kalkarmen oder kalkfreien Substraten fehlen, übrigens auch da nicht vorkommen, wo die Bedingungen für die Säurebildung ungünstig liegen. Tatsächlich ist, wie schon auf S. 467 bemerkt wurde, das Schwanken dieser Erscheinung für mehrere Fälle bereits bekannt (*M. racemosus, M. Rouxii*), für Diagnosen ist die Nädelcheninkrustation also mit Vorsicht heranzuziehen, ein konstantes morphologisches Merkmal ist die glatte oder rauhe Wand nicht; ob das Sporangium glatt oder mit feinen Nädelchen bezw. Kristallen besetzt ist, darüber entscheiden wohl lediglich die Umstände. Daß übrigens speziell auch bei *M. Mucedo* Oxalsäure auftritt, beweisen die Calciumoxalat-Ausfällungen (tetragonale Pyramiden), welche man gelegentlich in Nährlösungen wie z. B. Bierwürze antrifft.

Für die Ansäuerung (Bildung freier Säure) dürften nach den Erfahrungen mit *Aspergillus niger* als Material insbesondere Kohlenhydrate (Stärke, Zuckerarten), für die Oxalatbildung überhaupt vorzugsweise Eiweißstoffe (Peptone) sowie Salze anderer organischer Säuren in Frage kommen.

Mit der Entstehung einer solchen fixen Säure steht offenbar der häufig wahrgenommene esterartige Geruch der Kultur mancher Arten in Zusammenhang. Am auffälligsten ist er bei *M. piriformis*, der, zwischen anderen Arten stehend, nach Wehmer (7) geradezu an dem feinen, intensiv obstartigen Duft erkannt werden kann. Für andere Arten (*M. Mucedo, M. racemosus, M. circinelloides, Rhizopus nigricans*) ist das schon früher durch Brefeld (1) und Gayon (1), für *Rh. chinensis* neuerdings auch von Saito (1) beobachtet worden, immerhin ist dieser als birnen- oder pflaumenartig angegebene Geruch wenigstens bei den erstgenannten gewöhnlich nur schwach, deutlicher jedoch bei *M. Rouxii*, zumal auch *M. javanicus*, in seiner Art aber wieder verschieden. Ueber die Natur des nur in minimalen Mengen vorhandenen flüchtigen Stoffes ist in keinem Fall Näheres bekannt; da auch Alkohol vorhanden ist, handelt es sich wohl um Ester, es mag auch in Gärversuchen beobachteter Aldehyd beteiligt sein.

Gekennzeichnet sind unsere Mucoreen durch im großen und ganzen träges Gelatineverflüssigungsvermögen, ähnlich den hierin freilich noch trägeren Saccharomyceten und im Gegensatz zu den meisten Aspergillaceen, auch vieler Bakterien. Eine Ausnahme macht nach den bisherigen (eigenen) Feststellungen nur *M. piriformis*, der eine zehnprozentige Würzegelatine bei ca. 15° in wenigen Tagen verflüssigte, indes *M. Rouxii, M. javanicus, Rhizopus Oryzae* nebst *Chlamydomucor Oryzae* erst nach Wochen langsam zu verflüssigen begannen; ähnlich wie diese verhielten sich auch *M. Mucedo, M. racemosus*, ebenso die drei *Rhizopus*-Arten Saito's (1 u. 2). Wahrscheinlich werden da aber sehr verschie-

dene Momente abändernd wirken können; vergl. S. 255. Zweifelsohne bedürfte diese diagnostisch wichtige Frage einmal genauer Durcharbeitung. Vergleichbare Resultate werden natürlich nur bei Innehaltung derselben Bedingungen (Konzentration, Zusätze, Reaktion, Temperatur) erhalten, und zweckmäßig wäre, wenn man sich da 5 über eine ganz bestimmte Vorschrift einigte. Ueber proteolytische Enzyme überhaupt ist innerhalb dieser Gruppe wenig Genaueres bekannt. *M. Mucedo* baut jedenfalls Eiweißkörper energisch ab, Milcheiweiß wandelt er nach Teichert (1) binnen 20 Tagen zum größten Teil in Amidverbindungen um; diese Art findet sich neben *Oidium lactis* 10 und Penicillien auch häufig in Molkereiprodukten (s. Bd. II, S. 187). Daß bei der Reifung des Gammelost zwei nicht näher beschriebene *Mucor*-Arten tätig sind, ist auf S. 474 erwähnt worden. Casein und koaguliertes Eieralbumin werden nach J. Behrens (1) durch *Rhizopus nigricans* angegriffen. Ueber die Wirkung verschiedener Species (*M. Mu-* 15 *cedo, M. racemosus, M. spinosus, Rhizopus nigricans*) auf Gelatine, Milchcasein, Hühnereiweiß, Blutfibrin, Pflanzencasein liegen zu meist positiven Resultaten kommende Versuche von Steffens sowie Schäffer (1) vor, letzterer beobachtete merkliche Verflüssigung der 5-proz. Gelatine bei 25° durchweg schon nach 4—7 Tagen; da aber *M. racemosus* hier fast 20 ebenso prompt verflüssigte wie z. B. der *Aspergillus niger*, so wären diese Resultate jedenfalls durch Wiederholung sicher zu stellen. Eiweiß abbauende Wirkung spielt voraussichtlich auch bei der Aufschließung von Nahrungsmitteln (Sojabohnen) in Ostasien durch *Rhizopus Oryzae* (s. S. 494) sowie *Rh. Tamari* (s. S. 501) mit, schließlich auch da, wo *Mucor*-Arten 25 unbekannter Zugehörigkeit Häute und Leder zersetzen (s. Bd. V, S. 34). Als Endprodukt des Eiweißumsatzes tritt bei *Rhizopus nigricans* reichlich Oxalsäure (als Ammoniumoxalat) auf, so daß nach Wehmer (6) drei Gramm Pepton mehr als 0,5 g Calciumoxalat ergaben, derselbe *Rhizopus* sowie *M. racemosus* und *M. Mucedo* bauen dabei nach genaueren Feststellungen 30 von Butkewitsch (1) Fibrin oder Pepton zunächst zu Aminosäuren (Leucin, Tyrosin) ab, die jedoch weiter in Ammoniumsalze übergehen, sobald durch wiederholten Zusatz von Phosphorsäure für das Fortbestehen saurer Reaktion der Nährflüssigkeit gesorgt wird. Das proteolytische Enzym von Trypsin-Charakter fand sich sowohl im Mycel wie 35 in der Nährlösung, seine Bildung erwies sich von den Ernährungsbedingungen abhängig, indem es besonders reichlich in Peptonlösung auftrat; die Spaltung des Eiweißes in Aminosäuren verlief dabei zum Teil extracellular, innerhalb der Nährlösung; Zuckerzusatz hemmte die Eiweißspaltung bei *Rhizopus*, wie das auch schon aus früheren Versuchen 40 Wehmer's (6) hervorging. Ammoniakbildung durch *M. racemosus* in Bouillon (auch in Erde; vergl. Bd. III, S. 459) beobachteten im Jahre 1893 schon Muntz und Coudon (1).

Fettspaltung ist nur für einzelne Fälle sichergestellt; so wächst nach Hanuš und Stocký (1) der *M. Mucedo* üppig in Butter und ver- 45 braucht bezw. oxydiert das abgespaltene Glycerin sowie einen Teil der Fettsäuren (namentlich die niederen), läßt aber Oelsäure intakt. Aus einer unbestimmten *Mucor*-Art (in Käse beobachtet) wurde nach Laxa (1) durch Zerreiben das fettspaltende Enzym (Lipase) frei (s. Bd. II, S. 217). So machen auch *Mucor*-Arten fast regelmäßig einen, wenn auch kleinen 50 Teil der Butterflora aus (*M. racemosus, M. Mucedo*), worüber wiederholte Beobachtungen, z. B. von Happich (1), Reinhardt (1), Teichert (1) und anderen, vorliegen.

Ueber Glycosidspaltung machte Schäffer (1) für die schon genannten vier Arten Angaben; Amygdalin und Helicin, jedoch nicht myronsaures Kali, wurde von allen enzymatisch zerlegt.

In Nährböden mit Zusatz von Gips oder Fowler'scher Lösung entwickelt *M. Mucedo* etwas Schwefelwasserstoff bezw. Arsenwasserstoff; vergl. darüber H. R. Schmidt (1).

Die tierpathogene Wirkung einzelner Mucoreen (*M. corymbifer* = *Lichtheimia corymbifera*) beruht nach Barthelat, wie schon auf S. 479 bemerkt wurde, nicht auf Erzeugung besonderer chemischer Stoffe (Gifte), sondern ist lediglich nekrotisierend. Bei dem pflanzenpathogenen (Fruchtfäulepilz) *Rhizopus nigricans* wirkte nach J. Behrens (1) jedoch ein kochfester, fixer Giftstoff. Ob toxische Produkte beispielsweise in verschimmeltem Mais (s. Bd. I, S. 613) auf Rechnung speziell von *Mucor*-Arten zu setzen sind, steht dahin und bedürfte besonderen Nachweises.

Den Mucoreen mangelt gegenüber den Aspergillaceen fast gänzlich die Mannigfaltigkeit lebhafter Farben (grün, gelb, braun, rosa, violett), makroskopisch sind die Vegetationen gewöhnlich grau bis braunschwarz, seltener gelb bis orange; das dunkle Pigment ist in der Regel ein Membranfarbstoff (*Rhizopus*-Arten), das gelbe ist an Fettropfen des Zellinhalts gebunden (*M. Mucedo*, *M. hiemalis*, *M. Rouxii*, *M. javanicus* u. a.), über die chemische Natur dieser Farbstoffe ist bislang nichts bekannt. Die Verwandtschaft der *Mucor*-Arten würde darin gewissermaßen einen chemischen Ausdruck finden, wenn hier überall die gleiche Substanz vorläge. Das des *M. Rouxii* ist von Vuillemin (2) in feinen Kristallen isoliert worden; genügende Menge für eine chemische Analyse dürfte aber schwer zu beschaffen sein. —

Die nebenstehende Tabelle gibt zwecks schnellerer Orientierung eine Uebersicht der hier besprochenen *Mucor*- und *Rhizopus*-Arten mit ihren noch recht lückenhaft bekannten verschiedenen Wirkungen und Merkmalen. Wo ein besonderes Zeichen (+ oder 0) fehlt, liegen Angaben nicht vor; ihre Ergänzung ist Aufgabe weiterer Forschung. Bezüglich der genannten zuckerspaltenden Enzyme sei auch hier wiederholt, daß solche in der Regel nicht in Substanz nachgewiesen sind, sondern ihre Anwesenheit lediglich aus der bezüglichen gärungserregenden Wirkung des Pilzes auf die Disaccharide gefolgert wurde.

Literatur

zum Kapitel Chemische Wirkungen der Mucoreen.

***Bail,** (1) Journ. f. prakt. Chem., 1867, Bd. 101, S. 47. — (2) Flora, Regensburg, 1857, Bd. 3, S. 417. — (3) Ber. d. 35. Vers. Deutscher Naturforscher u. Aerzte in Königsberg, 1860, auch Progr. der St. Johannis-Realschule zu Danzig 1867. — (4) Verhandlg. d. K. Leop.-Carolin. Akad. zu Halle a. S., 1860, Bd. 27, (1861, Bd. 28, S. 23). ***Bainier,** (1) Ann. des Sciences nat., Bot., 1884, 6. sér., Bd. 19, S. 200. ***Bary,** A. de, (1) In: A. de Bary und Woronin, Beiträge z. Morphologie u. Physiologie d. Pilze, 2. Reihe, Frankfurt 1868, S. 21. — (2) Ueber Schimmel u. Hefe. Berlin 1869. ***Behrens,** J., (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 514. — (2) Ebenda, 1902, Bd. 8, S. 114. ***Biourge,** (1) La Cellule, 1895, Bd. 11, S. 95. ***Boidin** und **Rolants,** (1) La Bière, 1897, Bd. 5, S. 33. ***Brefeld,** (1) Landw. Jahrbücher, 1876, Bd. 5, S. 281. — (2) Untersuchungen aus d. Gesamtgebiet d. Mykologie, 1889, Heft 8, S. 222. ***Butkewitsch,** (1) Jahrb. wiss. Bot., 1903, Bd. 38, S. 147. ***Calmette,** (1) Ann. Pasteur, 1892, Bd. 6, S. 605. ***Chrzaszcz,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1901, Bd. 7, S. 326. ***Collette und Boidin,** (1) Bull. de l'Assoc. des Chim. de sucr. et de distill., Bd. 16, S. 862. ***Czapek,** (1) Biochemie der Pflanzen. Jena 1905, Bd. 1, S. 330. ***Dubourg,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1899, Bd. 128, S. 442. ***Eijkman,** (1) Centralbl. f. Bakt., 1894, Bd. 16, S. 99. ***Emmerling,** O., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1897, Bd. 30, S. 454. — (2)

Uebersicht der besprochenen *Mucor*- und *Rhizopus*-Arten nach Sporengröße (μ), Wachstumsoptimum (°C) und besonderen Wirkungen.

	Sporen (im Mittel und Grenzen)	Wachstums-optimum	Gär-wirkung	Säure-bildung	Invertase	Diastase	Sonstige Enzyme	Gelatine-ver-flüssigung
A) *Monomucor*:								
M. Mucedo	12—18 : 6—7	< 30°	+ (fast 0)	(schwach)	0 (?)	.	Protease. Lipase. Glycosidspaltende Enzyme	träge
M. piriformis	7 : 4,2; (5—13 : 4—8)	< 30°	+		.	.		schneller
M. hiemalis	7 : 3,2	< 30°		+	0	+	Pektinase	.
B) *Racemomucor*:								
M. racemosus	6 : 4,2	20—25°	+	+ bis 0	+	+ (?)	Keine Inulase, jedoch Protease, glycosidspaltende Enz.	träge
M. corymbifer	3 : 2	ca. 40°	0	.	+	.	.	.
M. fragilis	4,2 : 2,1	.	+	.	.	.	.	.
M. erectus	5—10 : 2,5—5	.	+	.	.	.	.	.
M. pusillus	3—3,5 (kuglig!)	ca. 40°	0	.	.	.	.	.
C) *Cymomucor*:								
M. Praini	4 : 3 bis 8 : 6	25°	+	.	0	+	.	träge
M. plumbeus (= *M. spinosus*)	6; (5—8) (kuglig!)	.	+	.	0	.	Protease. Glycosidspalt. E.	.
M. javanicus	5 : 4 bis 7 : 5	37°	+	+	0	+	.	träge
M. circinelloides . . .	3 : 4—5	35° (?) (über 30°)	+	.	0	+	.	.
M. alternans	2—3 : 5—6	.	+	+	0	+	Trehalase, Maltase	.
M. Rouxii	5 : 2,8	oberhalb 30°	+	+	0	+	Trehalase; Maltase	träge
M. ambiguus	7 : 4,5	.	.	.		.	.	.
D) *Rhizopus*:								
Rh. nigricans	9—12 : 7—8 (8—10 i. Dm.)	30—37° (s. Text S. 493)	+ (fast 0)	+	0 (?)	+	Pektinase, Protease, keine Cytase. Glycosidspaltende Enzyme, keine Maltase	.
Rh. Oryzae	6—8	ca. 37° (?)	0 (?)	+	0	+	Protease, Pektinase	träge
Rh. Cambodja	4,2—7,4 : 3,7—5,2	35—40	+ (schwach)	+	0	+	.	„
Rh. tonkinensis	8 : 6 (7,2 : 4,3)	36—38	+ (schwach)	?	0	+	keine Inulase, Raffinase u. Melibiase, aber Trehalase!	„
Rh. japonicus	9 : 6,5; (9 : 5,7)	36—38	+	+	+	+	Inulase, Raffinase, Melibiase; keine Trehalase!	„
Rh. oligosporus	7—10	30—35	+ (schwach)	.	0	+	Keine Inulase.	.
Rh. Tritici	5-6	30—35	+ (schwach)	+	0	+	.	schneller
Rh. chinensis	10 : 8; (5—7)	30—40	+	+	0	+	.	träge
Rh. japonicus var. angulosporus	12—18 : 8	.	+	.	+	+	Inulase, Melibiase, Raffinase.	.
Rh. Artocarpi	12—16; (4—30)	.	.	.	.	.	.	.
Rh. Tamari	6—12 : 4—8; (6—8)	.	+	.	+	+	Raffinase, weder Melibiase noch Inulase.	.

In: Roscoe-Schorlemmer's Lehrbuch d. Chemie, herausg. v. J. Brühl, 1901, 9. Bd., 7. Teil, S. 355. ***Fitz,** A., (1) Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., 1873, Bd. 6, S. 48. — (2) Ebenda, 1875, Bd. 8, S. 1540. — (3) Ebenda, 1876, Bd. 9, S. 1352. ***Fleroff,** (1) Cit. n. Nikolski (1). ***Gayon,** (1) Mém. Soc. Sciences de Bordeaux, 1878, 2. sér., Bd. 2, S. 249. ***Gayon und Dubourg,** (1) Ann. Pasteur, 1887, Bd. 1, S. 532. ***Godlewski,** E., (1) Bull. de l'Acad. des sciences de Cracovie, Cl. math. et nat., 1904, S. 115. ***Graf,** (1) 6. Jahresber. d. Lehr- und Versuchsstation Münchn. Brauer-Akademie. 1899 1900, S. 28. ***Hansen,** E. Chr., (1) Comptes rendus de Carlsberg, 1888, Bd. 2, S. 143. — (2) Ebenda, 1902, Bd. 5, S. 68. ***Hanuš und Stocký,** (1) Zeitschrift f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel, 1900, Bd. 3, S. 606. ***Happich,** (1) Zeitschrift f. Fleisch- u. Milchhygiene, 1901, Bd. 11, S. 257 u. 295. ***Henneberg,** W., (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1902, Bd. 25, S. 205. ***Johan-Olsen,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1898, Bd. 4, S. 161. ***Jost,** (1) Vorlesungen über Pflanzenphysiologie. Jena 1904, S. 251. ***Kean,** (1) Botan. Gazette, 1890, Bd. 15, S. 173. ***Klebs,** (1) Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. Jena 1896, S. 492. ***Kostytschew,** (1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1902, Bd. 20, S. 331. — (2) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 13, S. 490. ***Laxa,** (1) Arch. f. Hyg., 1902, Bd. 41, S. 119. ***Lindner,** P., (1) Mikroskop. Betriebskontrolle in d. Gärungsgewerben. 4. Aufl., Berlin 1905, S. 230. — (2) Ebenda, S. 234. ***Mayer,** Ad., (1) Die Gärungschemie. Heidelberg 1902, S. 54 u. 103. ***Miehe,** H., (1) Die Selbsterhitzung des Heus. Jena 1907, S. 78 u. 85. ***Miyoshi,** (1) Bot. Ztg. 1. Abt., 1894, Bd. 52, S. 1. ***Muntz und Coudon,** (1) Comptes rend. de l'Ac., 1893, Bd. 116, S. 395. ***Nechitch,** (1) Sur les ferments de deux levains de l'Inde. Université de Genève, Institut de Botan., 6. sér., 5. fasc., S. 1. ***Nikolski,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 12, S. 554. ***Palladin und Kostytschew,** (1) Z. f. physiolog. Chem., 1906, Bd. 48, S. 214. ***Pasteur,** (1) Etudes sur la Bière. Paris 1876, S. 126 bis 140. ***Pfeffer,** W., (1) Pflanzenphysiologie. 2. Aufl., 1897, Bd. 1, S. 556 u. 564. ***Prinsen Geerligs,** (1) Chem.-Ztg., 1896, Bd. 20, Nr. 9. ***Reess,** (1) Botan. Untersuchungen über Alkoholgärungspilze. Leipzig 1870, S. 52. ***Reinhardt,** K., (1) Dissert., Marburg 1902. ***Saito,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 13, S. 158. — (2) Ebenda, 1905, Bd. 14, S. 623. — (3) Ebenda, 1906, Bd. 17, S. 20 u. f. — (4) Ebenda, 1907, Bd. 18, S. 1. ***Sanguineti,** (1) Ann. Pasteur, 1897, Bd. 11, S. 264. ***Schäffer,** (1) Beiträge z. Kenntnis der von einigen Schimmelpilzen hervorgebrachten Enzyme. Dissert., Erlangen 1901. ***Schmidt,** H. R., (1) Sitzgsber. d. phys.-med. Societät Erlangen, 1898, Heft 30. ***Schützenberger,** (1) Die Gärungserscheinungen. Leipzig 1876, S. 165. ***Sitnikoff und Rommel,** (1) Z. f. Spiritusindustrie, 1900, Bd. 23, S. 391. ***Stoklasa,** (1) Z. f. physiolog. Chem., 1907, Bd. 50, S. 303. ***Teichert,** (1) Milchztg., 1903, Bd. 32, S. 786. — (2) Ebenda, 1902, Bd. 31, S. 801. ***van Tieghem,** (1) Ann. des Sciences nat., Bot., 1875, 6. sér., Bd. 1, S. 1. ***Vuillemin,** (1) Revue mycologique, 1902, Bd. 24, Nr. 93, S. 16. — (2) Ebenda, S. 12. ***Wehmer,** (1) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1904, Bd. 13, S. 277. — (2) Ebenda, 1905, Bd. 14, S. 556. — (3) Ebenda, 1905, Bd. 15, S. 8. — (4) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1905, Bd. 23, S. 122. — (5) Ebenda, S. 216. — (6) Bot. Ztg., 1891, S. 70, Tabelle III. — (7) Chem.-Ztg., 1895, Bd. 19, S. 2038. — (8) Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1900, Bd. 6, S. 353 u. 610; 1901, Bd. 7, S. 313. ***Went und Prinsen Geerligs,** (1) Verhandl. Koninkl. Akad. v. Wetensch. te Amsterdam, 1895, 2. sect., 4. Teil, Nr. 2; auch Archief voor de Java Suiker-Industrie, 1884. ***Zopf,** (1) Die Pilze. Breslau 1890, S. 189.

Sach-Register

zusammengestellt von

Dr. Alexander Kossowicz
in Wien.

(Ein Sternchen * vor der Seitenzahl bedeutet Abbildung. — Unter C bezw. K vermißte Stichwörter suche man unter K bezw. C. Wörter mit ä, ö, ü suche man alphabetisch unter ae, oe, ue. — Die Synonyma wichtiger Organismen sind angeführt, so daß man betr. eines solchen an mehreren Stellen nachzusehen haben wird.)

A.

B.

C.

D.

F.

G.

H.

I.

J.

K.

L.

M.

N.

O.

P.

Q.

R.

S.

T.

U.

V.

W.

X.

Z.

Berichtigungen.

Seite	Zeile	anstatt	lies
Seite 18	Zeile 26	anstatt Raýmann	lies Raýman
„ 38	Literatur	„ Barker, B. T. F.,	„ Barker, B. T. P.,
„ 38	„	„ Grönlund, (1) . . . Bd. 17,	„ Grönlund, (1) . . . Bd. 15.
„ 155	Zeile 4	„ durch welche	„ auf welchem
„ 157	„ 5—8	„ Ein anderes . . . ähnlich sind,	„ Die durch Züchtung auf Würzegelatine bei 25° C erzeugte asporogene Form von *Sacch. intermedius* (= *S. Past. II*) entwickelte Zellen, die in Würzekulturen Vegetationen hervorbrachten, von welchen einige dem *Sacch. ellipsoideus*, andere dem *Sach. Pastorianus* ähnlich waren.
„ 161	„ 47	„ Variation	„ Vegetation
„ 214	„ 44	„ Flachsröte	„ Flachsrotte
„ 251	„ 33	„ Myrosin	„ Sinigrin
„ 251	„ 34	„ Myrosins	„ Sinigrins
„ 270	„ 2	„ drei	„ zwei
„ 270	„ 3	„ S. 212	„ S. 214
„ 270	„ 4	„ vierte	„ dritte
„ 270	„ 5	„ *Mycosphaerellaceen*	„ *Mycosphaerellaceae*
„ 293	„ 1	„ Melicitose	„ Melecitose
„ 371	„ 24	„ Alchemisten	„ Alchimisten
„ 375	„ 11	„ das Milchsäureanhydrid	„ den Milchsäurealdehyd
„ 396	„ 6	„ sind.	„ ist.
„ 398	„ 7	„ O. E. von	„ E. O. von
„ 408	„ 12	„ s. S. 429	„ s. S. 428
„ 408	„ 46	„ Auszügen	„ Auszüge
„ 410	„ 1	„ rotem	„ roten
„ 412	„ 1	„ außerordentliche	„ außerordentlich
„ 431	„ 50	„ sprochen	„ gesprochen

Abkürzungen

der Zeitschriftentitel in den Literatur-Nachweisen.

Ann. de chim. et de phys. = Annales de chimie et de physique.
Ann. de microgr. = Annales de micrographie.
Ann. Pasteur = Annales de l'Institut Pasteur (Paris).
Arb. Kais. Ges.-Amt = Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte in Berlin.
Arch. d. Anat. u. Phys. = Archiv der Anatomie und Physiologie. Physiolog. Abt. (Du Bois-Reymond).
Arch. f. Hyg. = Archiv für Hygiene.
Beitr. z. Biol. d. Pflanz. = Beiträge zur Biologie der Pflanzen (Cohn).
Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. = Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft.
Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. = Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.
Biedermanns Centralbl. = Centralblatt für Agrikulturchemie (Biedermann).
Bot. Ztg. = Botanische Zeitung.
Centralbl. f. Bakt. = Centralblatt für Bakteriologie.
Chem.-Ztg. = Chemiker-Zeitung (Cöthen).
Comptes rend. de l'Ac. = Comptes rendus de l'Académie des sciences (Paris).
Comptes rendus de Carlsberg = Comptes rendus des travaux du laboratoire de Carlsberg, Kopenhagen.
Dinglers Journ. = Dinglers polytechnisches Journal.
Hyg. Rundsch. = Hygienische Rundschau.
Jahrb. wiss. Bot. = Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik (Pringsheim).
J. federated Inst. Brewing = Journal of the Federated Institutes of Brewing.
J. f. Landwirtschaft = Journal für Landwirtschaft.
J. f. prakt. Chem. = Journal für praktische Chemie.
Kochs Jahresb. = Kochs Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den Gärungsorganismen.
Landw. Jahrbücher = Landwirtschaftliche Jahrbücher (Berlin).
Landw. Jahrb. d. Schweiz = Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz.
Landw. Versuchsstationen = Die landwirtschaftlichen Versuchsstationen (Nobbe).
Liebigs Ann. = Annalen der Chemie und Pharmacie (Liebig).
Milchztg. = Milchzeitung.
Mitt. Kais. Ges.-Amt = Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt.
Monatsh. f. Chem. = Monatshefte für Chemie (Wien).
Pflügers Archiv = Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie.
Poggendorffs Ann. = Annalen der Physik und Chemie (Poggendorff).
Virchows Archiv = Archiv für pathologische Anatomie (Virchow).
W. f. Brauerei = Wochenschrift für Brauerei.
Z. f. Biologie = Zeitschrift f. Biologie.
Z. f. d. ges. Brauwesen = Zeitschrift für das gesamte Brauwesen (München).
Z. f. Hyg. = Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten.
Z. f. Nahrungsmittel-Unters. etc. = Zeitschrift für Nahrungsmittel-Untersuchung und Hygiene (Wien).
Z. f. Pflanzenkrankheiten = Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten.
Z. f. physiolog. Chem. = Zeitschrift für physiologische Chemie.
Z. f. Spiritusindustrie = Zeitschrift für Spiritusindustrie.
Z. f. wiss. Mikroskopie = Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie.

Lippert & Co. (G. Pätz'sche Buchdruckerei), Naumburg a. S.





